Realisierung der Morphogenese bei einem polyenergiden vegetativen Organismus (Botrytis cinerea)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Kowalski
aus Burg auf Fehmarn

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533913_0009

Realisierung der Morphogenese bei einem polyenergiden vegetativen Organismus (Botrytis cinerea)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Kowalski

aus Burg auf Fehmarn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof.Dr.G.Werz
2. Referent: Prof.Dr.W. Laskowski
Tag der mündlichen Prüfung:
1.: 16.12.75 2. und 3.: 18.12. 75

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung Seite 3

2. Material und Methoden 10
2.1. Untersuchungsobjekt 10
2.1.1. Normale Kulturbedingungen 10
2.1.2. Extreme Kulturbedingungen 11
2.1.3. Kultur auf Agarplatten 11
2.1.4. Kriterien für die Beurteilung des Phänotyps 13
2.1.5. Stammisolierung 18
2.1.6. Anlage eines Heterokaryosetests 20
2.2. Routineuntersuchungen 21
2.2.1. Bestimmung der Wachstumsraten 21
2.2.2. Bestimmung der Kernzahlen 21
2.2.3. Ernte größerer Mengen von Konidien 22
2.3. Biochemische Routineuntersuchungen 22
2.3.1. Isolierung der Cytosolproteine 22
2.3.2. Proteinbestimmung 23
2.3.3. Bestimmung des Aminosäuregesamtgehalts 24
2.3.4. Chromatographische Auftrennung von Aminosäuren 24
2.3.5. Nachweis von Peroxidase 25
2.3.6. Bestimmung von RNS 25
2.3.7. Bestimmung von DNS 26
2.3.8. Bestimmung von Glukose 26
2.4. Spezielle Untersuchungen 27
2.4.1. Isolierung der Zellwand 27
2.4.2. Elektrophorese 29
2.4.3. Charakterisierung des Pigments 31
2.4.4. Bestimmung von Tyrosinase 31
2.4.5. Bestimmung von Tyrosin 33
2.4.6. Übertragungsversuche 34
2.4.7. Isolierung der Kerne und Auftrennung im Dichtegradienten 37

2.4.8. Versuche mit Puromycin Seite 39
2.4.9. Bestimmung der Zellwandpermeabilität 40
2.4.10. Elektronenmikroskopie 41

3. Ergebnisse 43
3.1. Isolierung von Stämmen 44
3.1.1. Heterokaryosetests 48
3.1.2. Das Ergebnis der Stammisolierung, Stammtafel 56 57
3.1.3. Überprüfung der Stämme 58
3.1.4. Der Zellkernbestand der Stämme 60
3.1.5. Elektrophoretischen Charakterisierung der Stämme 64
3.1.6. Aminosäurekomposition der Zellwand 75
3.1.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 77
3.2. Konidienbildung 97
3.2.1. Der physiologische Zustand konidienbildender Zellen 99
3.2.2. Der Einfluß des Substrats 101
3.2.3. Die Zusammensetzung der Substrate 108
3.2.4. Die endogenen Faktoren der Konidienbildung 111
3.3. Pigmentbildung 118
3.4. Versuche mit Puromycin 127

4. Diskussion 139
4.1. Varianz und Vielkernigkeit 140
4.2. Die endogene Regulation der Morphogenese 143
4.3. Die exogene Regulation der Morphogenese 151
4.4. Wechselwirkungen zwischen endogenen und exogenen Faktoren 154

5. Zusammenfassung 158

6. Literaturverzeichnis 161

1. Einleitung

Der Begriff "Morphogenese" bezeichnet den Prozess der artspezifischen Formbildung während der Entwicklung und ist eng gekoppelt mit dem Begriff der "Differenzierung", mit dem das Verschiedenwerden von gleichen Zellen oder Zellverbänden zu Zellen mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben wird. Morphogenese stellt die Summe vieler Differenzierungsschritte dar. Wieweit eine Differenzierung erfolgt, hängt vom genetischen Material ab.

An der marinen Grünalge A c e t a b u l a r i a , die von HÄMMERLING (1931, 1932, 1943a) als günstiges Objekt für morphogenetische Untersuchungen erkannt worden ist, konnte gezeigt werden, daß morphogenetische Prozesse kerndeterminiert sind und daß eine Regulation der Morphogenese auf translationaler und posttranslationaler Ebene stattfindet (HÄMMERLING, 1934a; 1934b; GIARDINA, 1954; CLAUSS und WERZ, 1961; WERZ, 1965; 1969). Versuche, bei denen das gesamte Genom eines Organismus in einen anderen artfremden Organismus transplantiert worden ist, haben ergeben, daß es kerndeterminierte "morphogenetische Substanzen" geben muß, die Entwicklungsvorgänge fördern oder hemmen (HÄMMERLING, 1940; 1943b; 1946a; 1958; 1963a; 1963b; BETH, 1943a; 1943b; 1953). Diese Substanzen sind verantwortlich für artspezifische Strukturänderungen einer Zelle, z.B. für die Ausbildung eines Hutes bei A c e t a b u l a r i a ; sie sind per definitionem identisch mit m-RNS (HÄMMERLING, 1934b). A c e t a b u l a r i a hat sich als besonders große, leicht manipulierbare einkernige Zelle insbesondere für Untersu-

chungen über heterokaryotische Systeme bewährt. Sie setzt jedoch mancher spezifischen Fragestellung natürliche Grenzen: so lassen sich zwar Homo- und Heterokaryonten mit drei, vier oder auch mehr Kernen herstellen [1]), aber physiologisch definierte Entwicklungsstadien sind biochemisch kaum charakterisierbar, da es praktisch unmöglich ist, diese Stadien in genügender Quantität zu erhalten.

An einigen anderen Objekten sind morphogenetische Studien betrieben worden: an Bakterien (zusammenfassende Übersicht bei SZULMAJSTER, 1973), an Cyanophyceen wie A n a b a e n a (TALPASAYI und BAHAL, 1967; FAY, 1969) und N o s t o c (LAZAROFF, 1973), an Pilzen wie P h y c o m y c e s (zusammenfassende Übersicht bei BARTNICKI-GARCIA, 169 a und b), D i c t y o s t e l i u m (zusammenfassende Arbeiten bei AINSWORTH und SUSSMAN, 1966), B l a s t o c l a d i e l l a (CANTINO, 1966), an A s c o m y c e t e s (zusammenfassende Übersicht bei TURIAN, 1966), an B a s i d i o m y c e t e s (Übersicht bei TABER, 1966) und an tierischen Objekten (Übersicht bei SUSSMAN, 1964). Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Morphogenetische Leistungen einer Zelle sind bei pflanzlichen Organismen von einer Änderung des Zellwandaufbaus [2]), des physiologischen Zustands [3]), der chemischen Zusammensetzung des Plasmas [4]) sowie der Verteilung und Funktion der Organellen in der Zelle begleitet [5])

---

[1]) HÄMMERLING, 1946;1955; MASCHLANKA, 1943; 1946; WERZ, 1957; ZETSCHE, 1963a; SCHWEIGER et al. 1969

[2]) NORTHCOTE, 1952; ZALOKAR, 1959; DE TERRA und TATUM, 1963; ARONSON, 1966; MAHADEVAN und TATUM, 1965; TANAKA, 1966; ZETSCHE, 1967; BARTNICKI-GARCIA, 1968; LOWRY und SUSSMAN, 1968; BARRTNICKI-GARCIA und LIPPMANN, 1969; McCOY et al., 1971; HEATH et al., 1971; MAHADEVAN und MAHADKAR, 1972; FULTZ und WOLF, 1972; WERZ, 1963

[3]) RIPPEL und BEHR, 1930; HAWKER, 1950; LILLY und BARNETT, 1951; LILLY, 1966

[4]) WRIGHT und ANDERSON, 1960; CANTINO und LOVETT, 1964; BALDWIN und RUSCH, 1964; SAUER et al., 1969

[5]) DIAKEMAKOS et al., 1965; PARK und ROBINSON, 1966 a und b

Eine direkte Beeinflussung der Protein s y n t h e s e durch extra- und intrazelluläre Faktoren kann zu einer Differenzierung führen [1]. Solche Faktoren können anorganische [2] oder organische [3] Verbindungen sein. Hinzu kommen wichtige physiologische Faktoren, wie Licht und Temperatur der Umgebung und pH-Wert des Nährsubstrats [4], die eine spontane Stoffwechselaktivität und darüber hinaus auch eine Synthese von Membrankomplexen induzieren [5]. Die meisten morphogenetischen Prozesse unterliegen einer enzymatischen Regulation [6], einer differentiellen Enzymsynthese und -aktivität [7] und vielfach einer hormonalen Steuerung [8].

---

[1]) FRIES, 1943; RAPER, 1952; KRICHEWSKY und WRIGHT, 1963; WERZ, 1965; van Etten,1968; van ETTEN et al. 1968; 1969 a und b; POSNER, 1970; BUTLER, 1972;

[2]) LAMBERT, 1933; BARTNICKI-GARCIA und NICKERSON, 1962; NIEDERPRUEM, 1963; TSCHIERPE, 1964; GRAAFSMAN, 1973

[3]) TAHA und KNIGHTS, 1961; CROCKEN und NYC, 1964; LEAL et al. 1964; HASKINS et al., 1964; FRIES, 1966; NEIDHARDT, 1966; WRIGHT, 1966; CRANDALL und BROCK, 1968; LYSEK und ESSER, 1971; REISSING und GLASGOW, 171; BUTLER, 1972; MILLS,1973; MOORE-LANDECKER und STOTZKY, 1972; 1973

[4]) BETH, 1955 a und b;WERZ und HÄMMERLING, 1961; RICHTER, 1962; CLAUSS, 1963, 1968; HWKER, 1966; RUDOLPH und FURCH, 1970; LECH, 1972; INESI et al., 1973

[5]) GLASER und BROWN, 1957; KORNBERG et al., 1958; WERZ, 1967; 1968; KUSHNER, 1969;

[6]) CANTINO und LOVETT, 1964; ZETSCHE 1966 a; DAVIS, 1967; BROWN und YOUNG, 1967; ZETSCHE, 1968; COVE und PATEMAN, 1969; CHUNG und TREVITHICK, 1970; MAHADEVAN und MAHADKAR, 1970;RIEDEL und GERISCH, 1971; 1973; COVE, 1974

[7]) Übersicht bei FINCHAM, 1960; BROWN und LITTNA, 1964; ZETSCHE, 1966 b; 1968; 1969; MIZUKAMI und IWABUCHI, 1970; TROCHA und DALY, 1970; KADOWAKY und HALVORSON, 1971; FOUQUET, 1974; KILLIC und WRIGHT, 1974

[8]) ZETSCHE, 1963 b; Übersicht beiMACHLIS, 1966;

Welche spezielle Rolle dem Kern während der Morphogenese zukommt, läßt sich einerseits an einem heterokaryotischen System und andererseits an der Gegenüberstellung der Leistungen kernloser und kernhaltiger Systeme erarbeiten. Neben den Untersuchungen an Acetabularia [1]) und Amoeben [2]), insbesondere aber Arbeiten über heterokaryotische Pilze [3]), ist über die spezifische Bedeutung der Kerne mit unterschiedlichem genetischen Material innerhalb eines Systems während des Ablaufs der Differenzierung nur sehr wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit den Problemen, ob und wie sich in einem natürlich vielkernigen heterokaryotischen System die verschiedenen Kerne und deren Produkte gegenseitig beeinflussen und welche Folgen diese Interaktionen für die Ausbildung morphogenetischer Merkmale haben. Die Frage, ob Morphogenese in einem solchen System das Ergebnis von stadienspezifischen Aktivitäten gleicher oder verschiedener Kerne ist und inwieweit kernabhängige und kernunabhängige Faktoren an der Differenzierung beteiligt sind, ist an Pilzen bisher noch nicht untersucht worden, obwohl gerade unter den Ascomycetes und Basidiomycetes günstige Objekte zu finden sind (LYSEK, 1974).

---

[1]) HÄMMERLING, 1932; HÄMMERLING et al. 1958; KECK und CLAUSS, 1958; SCHWEIGER und BREMER, 1960; SCHWEIGER et al., 1969

[2]) WADDINGTON, 1959 ; JANTZEN, 1973

[3]) RAPER und SAN ANTONIO, 1956; BUXTON, 1954; GARNJOBST, 1955; BUXTON, 1956; PITTENGER und BRAWNER, 1961; SERRES, 1962; HUTCHINSON, 1963; PITTENGER, 1964; HOFFMANN, 1963; DAVIES, 1966; MISHRA, 1971

Diese Organismen weisen stadienspezifische, in zeitlich und physiologisch definierter Reihenfolge ablaufende Strukturänderungen auf. Die morphogenetischen Stadien sind biochemisch, physiologisch, cytologisch und genetisch charakterisierbar und die Einflüsse der Umgebung auf eine Strukturänderung lassen sich kontrollieren.

Unter den heterokaryotischen Pilzen ist B o t r y t i s c i n e r e a als Untersuchungsobjekt für diese Arbeit gewählt worden.

B. c i n e r e a gehört zu den D e u t e r o m y c e t e n und ist als phytopathogener Pilz bekannt. Er verursacht die sogenannte Graufäule der Weinbeere und hat eine Bedeutung für die Weinveredelung.

Im Zusammenhang mit der Fragestellung der Arbeit erschien das Objekt nicht nur wegen seines schnellen Wachstums, seiner relativ einfachen Kultivierung und der Möglichkeit, große Mengen von bestimmten Stadien zu gewinnen, besonders geeignet, sondern wegen seines Mangels an sexuellen Stadien. Obwohl der Organismus vielkernig ist, finden keine Kernverschmelzungen statt. W e l c h e Kerne und w i e v i e l e aus einer Konidienanlage schließlich in die Spore gelangen, ist zufallsbedingt. So stellt nicht nur die Konidie eine "Kolonie genetisch unterschiedlicher Kerne" dar, sondern auch das gesamte Mycel in allen seinen morphologischen Stadien. Die B o t r y t i s - Wildtypen sind daher in der Regel natürliche Heterokaryonten (HANSEN und SMITH, 1932).

Der experimentelle Ausgangspunkt der Arbeit lag in der Frage, ob es möglich sei, einkernige Konidien zu isolieren, die lebensfähig sind und sich differenzieren können. Aus solchen Konidien sollten Homokaryonten entstehen (was im Heterokaryosetest nachzuweisen ist). Gelänge es, mehrere Homokaryonten mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften zu gewinnen, so könnten definierte Differenzie-

rungsschritte während der Entwicklung biochemisch und cytologisch charakterisiert werden, z.B. die Keimung, die vegetative Phase und die Sporenbildung.

Bei günstiger Auswahl der morphologischen Marker (z.B. Konidienbildung und Pigmentierung) lassen sich aus artgleichen Homokaryonten wieder Heterokaryonten bilden, bei denen nun eine gegenseitige Beeinflussung der Kerne untersucht werden kann (HANSEN und SMITH, 1932). Es ist bekannt, daß eine hohe Konidiendichte in Kulturflüssigkeiten Anastomosenbildung fördert, mit der zwangsläufig eine Vermischung der Kerne einhergeht. Bei B. c i n e r e a findet eine Vermischung des Erbgutes nicht durch Kernverschmelzungen und Rekombination statt, sondern aufgrund des Austausches individueller Kerne.

Die Untersuchungen von LEONARD und DICK (1968) weisen auf eine weitere Möglichkeithin, zwischen kernabhängigen und kernunabhängigen Prozessen unterscheiden zu können. Die Autoren testeten zellwandfreies Zellhomogenat eines imperfekten Pilzes auf seine Wirkung bei der Fruchtkörperbildung eines in der Fruchtkörperbildung defekten Stammes von S c h i z o p h y l l u m . In ähnlicher Weise sind in der vorliegenden Arbeit Übertragungsversuche angelegt worden: intakte Empfängerzellen des einen Stammes wurden mit Plasmafraktionen (kernhaltig oder kernfrei, partikelfrei oder fraktioniert) eines Spenderstammes behandelt.

Zur rein morphologischen Charakterisierung der Isolate ist eine spezifischere Charakterisierung gewählt worden, indem die Cytosolproteine elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Pherogramme dienten sowohl dem Vergleich der Stämme miteinander als auch dem Vergleich von verschiedenen Entwicklungsstadien der Stämme. Weiterhin ist die Charakterisierung durch den Vergleich der Zellwandmorphologie und der Zellwandaminosäuren ergänzt worden. Die Informationen, die aus diesen vergleichenden Untersuchungen gewonnen werden konnten, dienten einmal der Überprüfung der Homogenität isolierter

Stämme und zum anderen als Ansatzpunkte zur Bearbeitung von kernabhängigen und kernunabhängigen Regulationsvorgängen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsobjekt

Die beiden Wildtypen WT 1 und WT 2 von *Botrytis cinerea* stammten aus der Sammlung THIELKE. Nach einem Heterokaryosetest konnten die beiden zur Verfügung gestellten Stammkulturen als "Wildtypen" identifiziert werden. Einige Versuchsgruppen sind an weiteren drei Wildtypen wiederholt worden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen. Der besonders hohe Heterokaryosegrad des einen Wildtyps gab Veranlassung, das Kulturmaterial als WT 3 mit in die Untersuchung aufzunehmen. Dieser Wildtyp entstammte einer *Botrytis* - Infektion auf Erdbeeren.

2.1.1. Normale Kulturbedingungen

Der Pilz ist auf synthetischem Nährboden kultiviert worden. Das nach RAULIN (MÜLLER und MELCHINGER, 1964) modifizierte Medium fand sowohl für Agar- als auch für Flüssigkulturen (50ml Medium im 100 ml-Erlenmeyerkolben) Verwendung und enthielt in 10 l destilliertem Wasser folgende Substanzen:

Ammoniumsulfat	1,65 g
sek.Ammoniumphosphat	4,0 g
Magnesiumkarbonat	2,6 g
Eisen-II-sulfat	0,46 g
Ammoniumtartrat	26,0 g
Kaliumkarbonat	4,0 g
Zinksulfat	0,46 g
Weinsäure	26,0 g
Saccharose	466,0 g

Schüttelkulturen waren lediglich für die Anzucht größerer Mengen von Submersmycel verwendet worden.
Die Kulturen wuchsen bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer gleichmäßigen Beleuchtung von oben im Hell-/Dunkelwechsel (12/12 h)
Die Stammkulturen der Wildtypen sind im Abstand von 8 Wochen

auf V 8 Agar "regeneriert" worden. Dieser von MILLER (1955) empfohlene Nährbodenzusatz mit seinem erhöhten Angebot an Spurenelementen hat eine wachstumsbeschleunigende und auf die Differenzierung verarmter Kulturen positive Wirkung. 0,3 l V8 Saft sind auf 5 l des oben beschriebenen "Vollmediums" gegeben worden und der pH-Wert mit Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt worden. Die Wirkung des V 8 Saftes auf den Pilz ist unabhängig davon, ob das Gesamtmedium autoklaviert wird oder der tyndallisierte V 8 Saft dem autoklavierten Medium bei 45°C zugesetzt wird [1].

Zur Aufbewahrung von älterem Kulturmaterial sind die bewachsenen Agarplatten in luft- und wasserundurchlässigen Plastiktüten verschlossen und bei 18° im Dunkeln gelagert worden. Spätestens nach 15 Wochen ist eine Überimpfung auf frischen Nährboden notwendig gewesen. Die Lagerung im Kühlschrank empfahl sich nicht, da hierbei morphologische Veränderungen am Kulturmaterial festgestellt werden konnten.

2.1.2. Extreme Kulturbedingungen

Für einige Zwecke war es notwendig, den Organismus extremen Kulturbedingungen auszusetzen. Hierfür wurden eine Reihe von "Mangelmedien" angeboten, denen im Gegensatz zum Vollmedium bestimmte Substanzen fehlten:

Medium I :	Vollmedium ohne Magnesiumkarbonat, ohne Weinsäure und ohne Saccharose
Medium II:	Vollmedium ohne Weinsäure und ohne Magnesiumkarbonat
Medium III:	V 8 - Agar ohne Zusätze
Medium IV :	Vollmedium mit 60 % Saccharose

2.1.3. Die Kultur auf Agarplatten

Für die Festmediumkulturen sind Einweg-Petrischalen verwen-

[1]) Tyndallisieren: 3 mal 40 min 70°C an drei aufeinanderfolgenden Tagen

det worden. Bei einfacher Überimpfung des Materials sind geringe Konidien- oder Mycelmengen mit der sterilen Impföse auf den frischen Nährboden gegeben worden. Sollte für bestimmte Fragestellungen eine bekannte Menge von Sporen überimpft werden, so ist aus einer Sporensuspension der Titer mit einer THOMA - Kammer ermittelt worden.

Einsporkulturen ließen sich am einfachsten aus Verdünnungsreihen einer Sporensuspension auf Agar isolieren: nach dem Ausstrich mit einem Drigalski-Spatel wurden einzeln liegende Sporen unter dem Präparationsmikroskop ermittelt, mit einer Lanzettnadel ausgestochen und auf eine neue Agarplatte übertragen.

In dem zentrisch angelegten Impffleck keimten die Sporen aus und die Hyphen breiteten sich fast exakt radiär über die Platte aus. Eine ausgewachsene Kultur ließ sich in fünf verschiedene Zonen einteilen, die die einzelnen Entwicklungsstadien charakterisieren (Abb. 1).

1 = Impfort
2 = Sklerotinisierungszone
3 = Differenzierungszone
4 = subapikale Zone
5 = Wachstumszone

Abbildung: 1
Wachstums- und Differenzierungszonen des Mycels

2.1.4. Kriterien für die Beurteilung des Phänotyps

Die phänotypischen Eigenschaften einer Kultur wurden wie folgt beurteilt:

1. in den ersten vier Tagen nach der Impfung:
   a) Keimungsverhalten und Wachstumsraten:
      Zeitpunkt der Keimung, polare oder bipolare Keimung, Wachstumsraten nach 10, 24 und 48 Stunden
   b) Form des jungen Mycels:
      Verzweigungsformen, exakt radiär oder unregelmäßiger Kulturrand, Kultur leicht wirbelartig
   c) Zeitpunkt der Bildung der ersten Lufthyphen

2. nach 10 Tagen (je nach Sporentiter auch später:
   a) Mycelhabitus:
      Oberflächenstruktur: glatt, rauh, mit oder ohne rhythmisch angeordneten Ringen von Lufthyphen, sehr flach dem Nährboden anliegendes Mycel oder flauschiges, üppiges Luftmycel (Abb. 2 - 4).
   b) Mycelfarbe:
      grau, weiß oder bräunlich
   c) Nährbodenfarbe:
      gelb, weiß, braun bis schwarz oder fleckig, in seltenen Fällen auch rot
   d) Konidienbildung:
      vorhanden oder nicht, üppig über die ganze Kultur verteilt oder nur spärlich, auf kleineren Mycelerhebungen oder auf glattem Mycel, rhythmisch oder unregelmäßig, Konidienfarbe: hellbraun oder schwarz (Abb. 5 - 7).
   e) Sklerotienbildung:
      vorhanden oder nicht, rhythmisch oder unregelmäßig, randständig oder über die ganze Kultur verteilt, großflächig oder klein (Abb. 8 - 13).

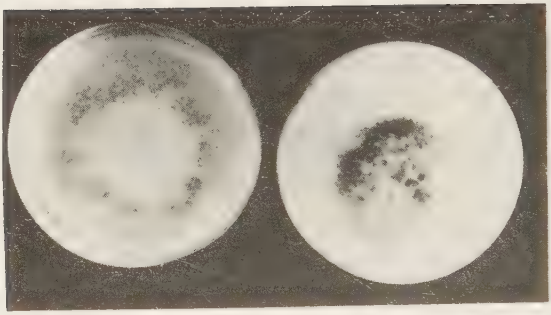


Abbildung: 2
Mycelhabitus,
glatte Oberflächenstruktur

⊢⊣ 1.8 cm

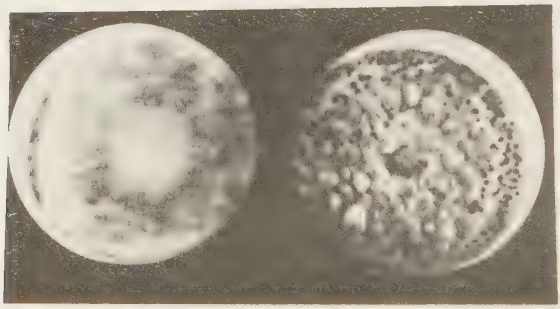


Abbildung: 3
Mycelhabitus,
rauhe Oberflächenstruktur

⊢⊣ 1.8 cm

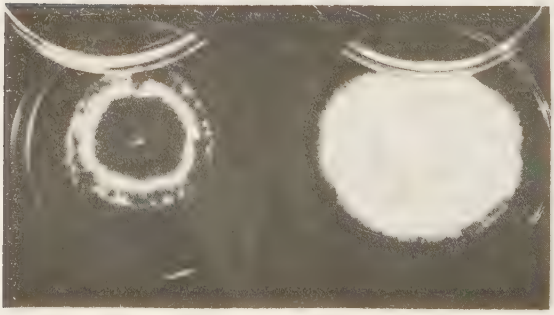


Abbildung: 4
Mycelhabitus,
flauschiges Oberflächenmycel

⊢⊣ 1.8 cm

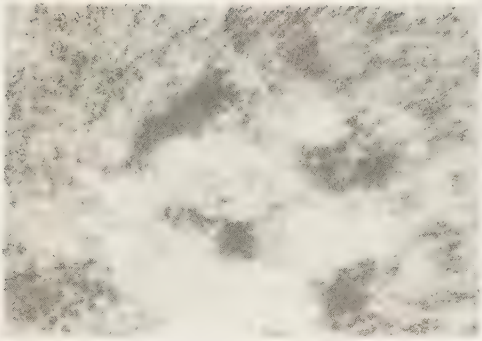


Abbildung: 5
Konidienbildung: üppig und über die ganze Kultur verteilt

⊢⊣ 0.5 cm

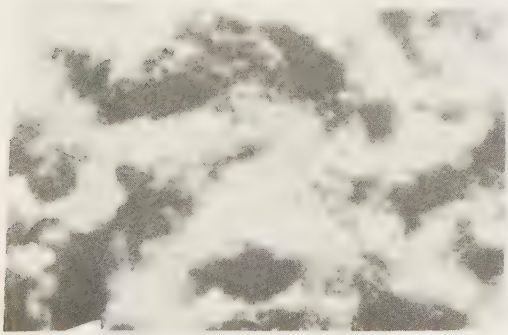


Abbildung: 6
Konidienbildung: spärlich und teilweise auf Myceleerhebungen

⊢⊣ 0.5 cm

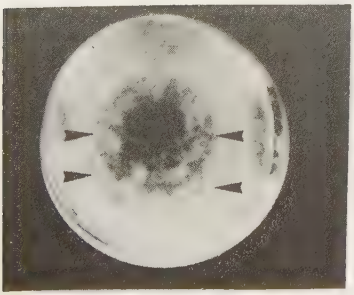


Abbildung: 7
Rhythmische Konidienbildung

⊢⊣ 1.8 cm

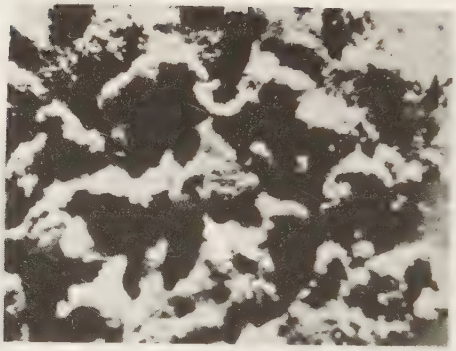


Abbildung:8
Sklerotienbildung:
großflächige Sklerotien

⟷ 0.3 cm

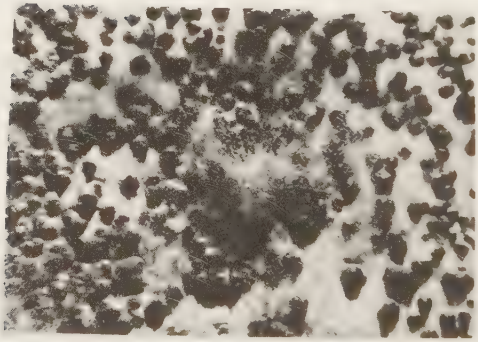


Abbildung: 9
Sklerotienbildung:
kleine, aber zahlreiche Sklerotien

⟷ 0.3 cm

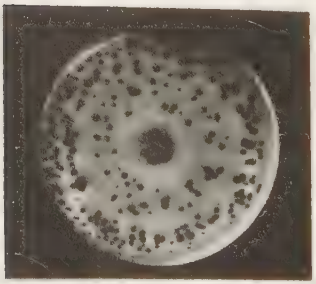


Abbildung: 10
Sklerotienbildung und Pigmentierung bei fehlender Pigmentierung des Mycels

⟷ 1.8 cm

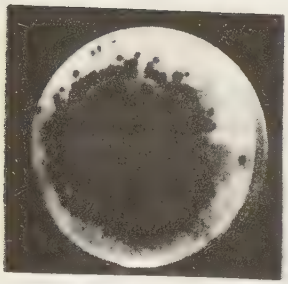


Abbildung: 11
Rhythmische Sklerotienbildung

⟷ 1.8 cm

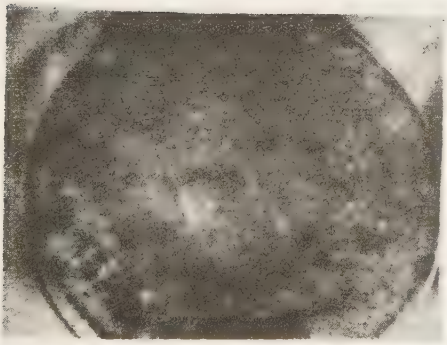


Abbildung: 12
Sklerotien, die über einen längeren Zeitraum weiß bleiben

⟷ 1 cm

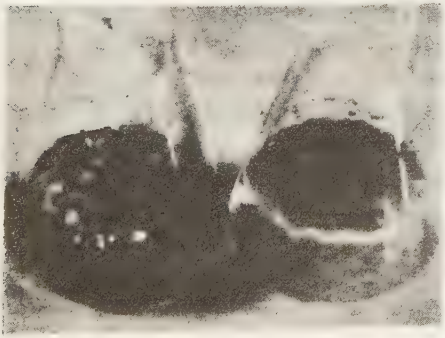


Abbildung: 13
Sklerotien- und Konidienbildung bei fehlender Pigmentierung des Nährmediums

⟷ 1.5 cm

2.1.5. Stammisolierung

Zur Stammisolierung wurden möglichst große Mengen von Konidien benötigt. Um diese zu erhalten, wurden Sporulationsansätze mit V 8 - Medium angelegt. 50 Kulturen wurden solange bei 20°C bebrütet, bis die gesamten Oberflächen dicht mit Konidien besetzt waren. Die Sporen wurden mit sterilem Wasser mit Hilfe eines sterilen Glasspatels abgeschwemmt. Die Sporensuspension ließ sich von Mycel- und Agarpartikel dadurch befreien, daß sie durch mehrere Lagen steriler Mullgaze filtriert wurde. Nach dem Abzentrifugieren der Sporen bei etwa 3000 Upm wurden die Konidien etwa 30 min unter ständigem Rühren in Phosphatpuffer (pH 6,5) gewaschen, um eine möglichst gleichmäßige Benetzung zu erreichen. Unbenetzte Sporen blieben am Glasrand und an der Oberfläche der Waschflüssigkeit, von wo sie abgesaugt und verworfen wurden. Die gewaschene, nochmals abzentrifugierte Suspension wurde mit 5 ml Phosphatpuffer (pH 6,5) und einem Tropfen Triton X 100 vorsichtig aufgeschwemmt und davon jeweils 1 ml auf einen Saccharosestufengradienten gegeben. Er bestand aus 50%, 30%, 10% und 3% Saccharoselösungen und wurde durch Übereinanderpipettieren der 4 Saccharoselösungen hergestellt, wenn es darauf ankam, aus den einzelnen Stufen Sporen zu isolieren, um sie auf ihre Kernzahlen und ihren Heterokaryosegrad zu testen und die Ergebnisse aus den einzelnen Fraktionen miteinander zu vergleichen. Im vereinfachten Verfahren genügte es, die Sporensuspension auf einen Gradienten zu legen, der aus 10%- tiger und 3%-tiger Saccharoselösung bestand. Die Auftrennung erfolgte bei 900 bis 1000 Upm für maximal 30 min. Auf der leichtesten Fraktion blieben die für die Stammisolierung verwendeten Sporen liegen. Ihre Größe wurde mikroskopisch bestimmt. Die Bestimmung der Konidienkernzahlen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Acridinorange (Lösung in Phosphatpuffer pH 5, Verdünnung 1:10 000). Konnte festgestellt werden, daß die Kernzahlen der leichten Fraktion

wesentlich unter denjenigen der Konidien aus der schweren Fraktion lagen, so sind die Konidien der leichten Fraktion mehrmals in steriler Nährlösung gewaschen worden, um die Kontamination durch Fremdkeime, die die bisherigen Manipulationen zwangsläufig mitsichbrachten, zu reduzieren. Aus der gewaschenen Suspension wurden Verdünnungsausstriche auf Agar angelegt und daraus wiederum Einzelsporen isoliert, die auf Vollmedium übertragen wurden (eine Spore pro Platte).

Zum Behandeln mit Temperaturschocks blieben die Sporen in ihrer Waschflüssigkeit solange liegen, bis sie ihre maximale Quellung erreicht hatten, was nach etwa 3 Stunden zu erwarten war. Sodann sind sie in die Nährlösungen übertragen worden, die die Temperaturen des ersten Wärmeschocks aufwiesen. Die Verwendung von Cellulosenitratrörchen gewährleistete beim Wechsel auf tiefere Temperaturen (Eisbad, $4^{o}C$) eine schnelle Abkühlung der Suspension. Die behandelten Sporen sind wiederum im Verdünnungsausstrich ausplattiert und daraus Einsporkulturen isoliert worden.

Nach 8 - 12 Stunden folgte in beiden Kulturgruppen die Ermittlung der Wachstumsraten, die als Längenzunahme der Keim- oder Haupthyphe pro Zeiteinheit definiert ist. Kulturen mit sehr niedrigen Wachstumsraten galten zunächst als aussichtsreich für die Stammisolierung, zumal ein direktes Verhältnis zwischen der Anzahl der Sporenkerne und der Wachstumsrate festgestellt werden konnte: wenigkernige Sporen keimen später und wachsen in den ersten 24 Stunden nach der Keimung langsamer als vielkernige.

Die isolierten und behandelten Kulturen sind nach 10 bis 15 Tagen miteinander verglichen worden und auf ihre phänotypischen Eigenschaften hin untersucht worden. Die konidienfreien Isolate sind daraufhin getestet worden, ob sich durch Nährbodenzusätze (wie Malzin oder V 8 Saft) eine Konidienbildung induzieren ließ, oder ob der Prozess durch Dauerlicht induzierbar sei. Blieben die Tests negativ, so konnte

damit gerechnet werden, einen konidienfreien Stamm isoliert zu haben.

Die pigmentfreien Isolate sind daraufhin getestet worden, ob sich bei ihnen durch Dauerlicht oder erhöhte Zuckerkonzentrationen im Medium Pigmentbildung auslösen ließ. Blieb die Bemühung erfolglos, so konnte hier eventuell ein pigmentfreier Stamm vorgelegen haben.

Auf Schrägagarplatten, auf denen der Pilz einem immer dünner werdenden, trocknerem Nährboden entgegenwächst, bis er auf die freie Glasfläche stößt, konnte die Fähigkeit zur Sklerotienbildung getestet werden: blieb sie auf dem trocknen und dünnen Nährboden aus, so lag hier eventuell ein sklerotienfreier Stamm vor.

Die endgültige Entscheidung, ob es sich bei den Isolaten um "Stämme" handelte oder nicht, wurde nach einem Heterokaryosetest gefällt.

2.1.6. Anlage eines Heterokaryosetests

Der Grad der Heterokaryose wird durch die Anzahl unterschiedlicher Kerne in einer Spore bzw. im Mycel bestimmt. Das phänotypische Bild, das ein aus einer einzelnen Spore entstandenes Mycel zeigt, wird entweder dem ihrer Ursprungskultur entsprechen oder nicht. Bei sporulierenden Kulturen wurde der Heterokaryosegrad durch den Vergleich von mindestens 30 Einsporisolaten aus einer Ausgangskultur bestimmt. Bei konidienfreien Kulturen (wie einigen Stämmen) dienten kleine Mycelstücke, die der Differenzierungszone der Ausgangskultur entnommen wurden, als Äquivalente für die fehlenden Sporen. Nach 3 Wochen wurden die Kulturen phänotypisch miteinander verglichen, sowie auf Melanine und Oxidasen getestet. Die Kulturen mit gleichen Merkmalen oder Merkmalskombinationen wurden zu Gruppen zusammengestellt und deren Größe als "prozentualer Anteil der einander identisch-

en Kulturen" gegenüber der Gesamtzahl aller Kulturen ermittelt. Je mehr Gruppen sich zusammenstellen ließen und je ähnlicher deren Größe war, desto höher war der Heterokaryosegrad. Im Abstand von etwa 5 Generationen ist der Heterokaryosegrad bei den einzelnen Stämmen überprüft worden.

2.2. Routineuntersuchungen

2.2.1. Bestimmung der Wachstumsraten

Solange das Mycel einer B. c i n e r e a Kultur noch nicht die gesamte Nährbodenfläche einer Petrischale überwucherte, ließen sich Wachstumsraten bestimmen. Mit Hilfe eines Okularschraubenmikrometers (LEITZ) wurde die Längenzunahme von Haupthyphen in einer bestimmten Zeiteinheit gemessen. Die Größe dieser Zeiteinheit richtete sich nach Zustand, Alter und Konidiendichte des Impfflecks. Die Ergebnisse wurden auf µ/h umgerechnet.

2.2.2. Bestimmung der Kernzahlen

Die Kernzahlen eines wenige Stunden alten Keimmycels gaben im Zusammenhang mit der Wachstumsrate einen sicheren Hinweis auf die ursprüngliche Kernzahl der dazugehörigen Konidie. An den Einsporkulturen, die als mögliche Stämme isoliert wurden, konnten die Kernzahlen natürlich nicht direkt bestimmt werden. Aus der selben Fraktion des Dichtegradienten, aus dem die Sporen für die Stammisolierung gewonnen wurden, mußte eine Reihe von Parallelkulturen zur Kernzahlbestimmung angelegt werden. Die Sporen wurden hierfür auf einen Gelatinefilm gebracht, der sich auf einem Objektträger befand. Der Gelatinefilm bestand aus Vollmedium, das statt Agar 25 % Gelatine enthielt. Die Kulturen wurden in sterilen feuchten Kammern gehalten. Die Zählung der Kerne erfolgte im Phasenkontrast.

Konidienkernzahlen ließen sich an vorgequollenen Konidien

nach Zusatz einer sauren Acridinorangelösung (Verdünnung 1 : 10 000, pH 4) fluoreszenzmikroskopisch bestimmen.

2.2.3. Ernte größerer Mengen von Konidien

Um größere Konidienmengen zu erhalten, wurden die Kulturen auf Vollmedium mit V 8 Zusatz herangezogen. Waren die Platten dicht mit Konidien besetzt, so wurden die Sporen mit sterilem Wasser abgespült und die Sporensuspensionen gesammelt, abzentrifugiert, mehrere Male in kaltem, sterilem Wasser gewaschen und schließlich in Phosphatpuffer nach Sörenson, pH 7, überführt oder zum Zwecke der Proteinisolierung aus Konidien in den Proteinisolierungspuffer gegeben.

2.3. Biochemische Routineuntersuchungen

2.3.1. Isolierung der Cytosolproteine

Zur Proteinisolierung mußte das Mycel von älterem, abgestorbenem Mycelfilz frei sein, was durch leichtes Abpinseln in Phosphatpuffer (pH 7) erreicht wurde. Drei- bis viermaliges Waschen in Phosphatpuffer beseitigte Schleimstoffe und Nährmediumreste. Bei der letzten Waschung wurde der Phosphatpuffer gegen den Isolierungspuffer ausgetauscht, der aus 1,2 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,5 g Ammoniumchlorid, 2,1 g Magnesiumacetat und 2,3 g Mercaptoäthanol pro Liter destilliertem Wasser bestand und auf pH 8,3 eingestellt wurde. Das Zellmaterial wurde dann im Homogenisator (VIRTIS) bei 40 000 Upm mit Messern im Eisbad innerhalb von 2 - 3 min zerkleinert. Hierbei kamen auf etwa 50 g Mycel (Frischgewicht) 20 ml Puffer. Je nach Alter und Zustand der Mycelien empfahl es sich, die zerkleinerten Hyphen im Potter-Homogenisator nochmals zu zerquetschen. Weiches Submersmycel wurde sofort im Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 min bei 5 000 Upm in einer CHRIST -

Kühlzentrifuge ("MINIFUGE") zentrifugiert und der Überstand eingeengt. Hierfür wurden geringe Mengen Sephadex G 50 trokken dem Überstand zugesetzt. Die Pufferlösung drang in das Gel ein, während sich die Proteine an der Geloberfläche sammelten und dekantiert werden konnten. Die Verwendung von Kollodiumhülsen der Firma SERVA, in denen sich Proteinlösungen durch Unterdruckdialyse anreichern ließen, hat sich ebenfalls bewährt.

Für eine weitere Reinigung der Proteine schloß sich erneutes Zentrifugieren bei 66 000xg für eine Stunde in einer BECKMANN-Ultrazentrifuge an. Bei älterem Oberflächenmycel wurden die Proteine hierfür auf eine 20%-tige Saccharoselösung gegeben. An der Grenzschicht bildete sich bei stark verschleimtem Material während des Zentrifugierens ein Film, der Überstand war dann frei von störenden Schleimstoffen.

Eine andere Möglichkeit der Reinigung bot die Fällung der Proteine mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung. Das gefällte Material wurde kurz im Isolierungspuffer gewaschen und erneut darin gelöst. Dieser Vorgang wurde eventuell solange wiederholt, bis die Proteinlösung glasklar war.

Für Hydrolysen zum Zwecke der Aminosäuregesamtbestimmung und der chromatographischen Auftrennung der Aminosäuren sind die gereingten Proteinlösungen gefriergetrocknet worden. Bis zur Verwendung lagerten sie bei - 18°C.

2.3.2. Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte nach der Methode von LOWRY (1951). Hierfür wurde genau gewogenes gefriergetrocknetes Mycel (oder je nach Ziel der Bestimmung auch gefriergetrocknete Proteine selber) in Phosphatpuffer (pH 8,3) gelöst. Sowohl Hyphen- als auch Proteinmaterial mußten dazu im Porzellanmörser fein pulverisiert werden. Die Durchführung der Bestimmung entsprach den Angaben von LOWRY.

2.3.3. Bestimmung des Aminosäuregesamtgehalts

Genau ausgewogene Mengen gefriergetrockneten Proteinmaterials wurden in 2 g 6 N Salzsäure in Ampullen gegeben. Die Ampullen wurden unter Stickstoffbegasung zugeschmolzen. Die Hydrolysezeiten betrugen für Proteinlösungen 18 Stunden und für Zellwandmaterial 30 Stunden, dabei waren die Proben einer Temperatur von 120°C ausgesetzt. Das Hydrolysat wurde über Membranfilter (0,2 µ Porengröße) von seinen Rückständen befreit und quantitativ in Wägegläschen überführt, dann im Vakuum über konzentrierter Natronlauge eingetrocknet, schließlich in 0,5 ml 0,1 N Salzsäure gelöst und der Aminosäuregesamtbestimmung unterworfen oder chromatographisch aufgetrennt. Die Durchführung der Aminosäuregesamtbestimmung erfolgte nach den Angaben von MOORE und STEIN (1948). Als Eichsubstanz diente Leucin.

2.3.4. Chromatographische Auftrennung der Aminosäuren

Die Hydrolysate wurden durch zweidimensionale zweiphasische Dünnschichtchromatographie auf MERCK-Zelluloseplatten aufgetrennt. Hierfür wurden 1 - 20 µl Hydrolysat auf die Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Auftragungsmenge richtete sich nach dem Ausgangsmaterial: Plasmaproteinhydrolysate waren stets reich an Aminosäuren, sodaß 1 µl für eine Aminosäureauftrennung ausreichten. Zellwandhydrolysate enthielten nur geringe Mengen an Aminosäuren, sodaß stets mindestens 10 µl für die eindimensionale Trennung aufgetragen wurden und für die zweidimensionale Chromatographie 20 µl benötigt wurden.
In der ersten Laufrichtung wurde ein Butanol/Eisessig/Wasser-Gemisch im Mischungsverhältnis 4 : 1 : 1 verwendet und in der zweiten Laufrichtung wassergesättigtes Phenol. Nach der Trocknung wurden die Aminosäuren mit Ninhydrinreagenz nachgewiesen und die Platten im Dünnschichtscanner der Firma ZEISS bei einer Wellenlänge von 590 nm ausgewertet, sowie von einem SERVOCOR - Schreiber aufgezeichnet. Zur grafischen Darstellung

der Ergebnisse sind die Flächen unter den Kurven ermittelt und diese Werte im Sterndiagramm dargestellt worden. Hierfür wurden auf einem Kreis mit beliebigem Durchmesser 13 Punkte in gleichem Abstand voneinander eingetragen und jeder mit dem Mittelpunkt des Kreises verbunden. Jeder dieser 13 Radien stellt eine Aminosäure dar. Der Wert, der als Fläche unter der Scankurve für die jeweilige Aminosäure ermittelt wurde, ist als Länge eines Radius abgetragen worden. Die Endpunkte aller Radien wurden dann miteinander verbunden, wodurch die vorliegenden Sterndiagramme entstanden.

2.3.5. Nachweis von Peroxidase (EC 1. 11.1.7.)

Die Bestimmung der Peroxidasen erfolgte nach den Angaben von SCHRAUWEN (1966) mit einem Benzidin/Guajakol-Gemisch. Für die Bestimmung der Oxidasen des Plasmas wurden 0,1, 0,2 und 0,5 ml zellwand- und partikelfreies Zellhomogenat verwendet. Für den Nachweis der Oxidasen im bewachsenen Medium wurden der Bestimmung 5ml Medium zugrundegelegt.

2.3.6. Bestimmung von Ribonukleinsäure

Die Bestimmung von RNS erfolgte nach den Angaben von WEBB (1956) mit p-Bromphenolhydrazin. Für die Bestimmung des RNS-Gehalts bestimmter Mycelregionen wurden die Mycelien auf Nährböden kultiviert, die mit Cellophanfolie abgedeckt wurden, sodaß die Kulturen vom Nährboden abgezogen werden konnten. Die gewünschten Mycelregionen wurden ausgeschnitten und aus mehreren Kulturen gesammelt, gewaschen und gefriergetrocknet. Das Material wurde anschließend fein pulverisiert und für die RNS-Bestimmung genau gewogen. Den Angaben über den RNS-Gehalt des Mycels liegt das Trockengewicht als Bezugsgröße zugrunde.

Sollte der RNS-Gehalt im Nährboden ermittelt werden, so wurde bewachsener, fester Nährboden vom Mycel befreit, fein zerkrümelt und 2g dieses Agars für 24 Stunden bei 4°C mit 2 ml Phosphatpuffer (pH 7) eluiert. Als Kontrolle diente unbewachsener Nährboden. Das Eluat wurde durch Membranfiltration (SARTORIUS Membranfilter, Porengröße 1,2 µ) von den Resten des Nährbodens befreit. Für die RNS-Bestimmung nach WEBB (1956) wurde 1 ml dieses Eluats verwendet.

2.3.7. Bestimmung der Deoxyribonukleinsäure

Die Bestimmung von DNS erfolgte nach den Angaben von WEBB und LEVY (1955) mit p-Nitophenolhydrazin. Es wurde in der gleichen Weise verfahren wie unter 2.3.6. angegeben.

2.3.8. Bestimmung von Glukose

Die Bestimmung von Glukose im Nährboden erfolgte nach den Angaben von MERCK (1973) mit o-Toluidin. (E.MERCK, Diagnostisches Handbuch, 1973)

2.4. Spezielle Untersuchungen

2.4.1. Isolierung der Zellwand

GIRBARDT (1973) hat betont, daß die Methoden zur Isolierung von plasmafreier Zellwand von Hyphenpilzen den jeweiligen Organismen angepaßt werden müßten. Als Grundlage für die Zellwandisolierung bei B. c i n e r e a innerhalb der vorliegenden Arbeit dienten Angaben von BARTNICKI-GARCIA (1968. 1969) und BARTNICKI-GARCIA et al. (1968), die für B. c i ne r e a entsprechend modifiziert worden sind.

Für eine Zellwandisolierung wurden mindestens 50 g frisch geerntetes Mycel (Frischgewicht) benötigt. Nach gründlichem Waschen in destilliertem Wasser wurde das Material in kalten Protein-Isolierungspuffer überführt, zumal nach dem Homogenisieren des Mycels der zellwandfreie Überstand für Proteinbestimmungen, Elektrophoresen oder Übertragungsversuche durchaus verwertbar war. Als Homogenisator diente das Gerät der Firma VIRTIS. Um das Proteingemisch, das eventuell weiterverarbeitet werden sollte, zu schonen, wurde zunächst nur 3 min homogenisiert, wobei Messer angewendet wurden. Nach dem Zentrifugieren (10 min 5 000 Upm, CHRIST-Minifuge) wurde der Rückstand in wenig Phosphatpuffer aufgenommen und nochmals homogenisiert (10 min volle Umdrehungszahl des Homogenisators), erneut zentrifugiert und der Rückstand in kaltem Äther ausgeschüttelt (10 min). Dem Äther wurde dann die gleiche Menge Phosphatpuffer zugesetzt und das Gemisch nochmals gründlich geschüttelt und im Scheidetrichter getrennt. Die Pufferphase wurde erneut mit Äther versetzt, das Gemisch nochmals ausgeschüttelt und im Scheidetrichter getrennt. Aus der Pufferphase wurde durch Zentrifugieren das Zellwandmaterial zurückgewonnen und in Chloroform überführt, darin 10 min leicht gerührt (Eisbad) und nach und nach Phosphatpuffer zugegeben, bis ein Mischungsverhältnis von 1 : 1 (Puffer : Chloroform) entstand. Beide Phasen wurden als Ge-

misch zentrifugiert (5min 2 000 Upm, CHRIST-Minifuge). Auf der Chloroformschicht lag dann die Zellwand, die vorsichtig abgehebert wurde. Hieran schlossen sich Waschungen, wobei der Waschpuffer (Phosphatpuffer pH 7) solange gewechselt wurde, bis keinerlei Chloroform mehr vorhanden war. Dann wurde das Zellwandmaterial mit Glasperlen versetzt (0,13 mm Ø , 5 g Glasperlen auf 10 g Material), mit einer geringen Menge Phosphatpuffer verrührt und erneut homogenisiert. Die Dauer dieses Homogenisierens richtete sich nach dem Grad der Zerstörung der teilweise noch intakten Hyphen: im Abstand von 5 min wurde das Homogenat mikroskopisch kontrolliert, waren etwa 50 % offene Hyphen vorhanden, so wurde das Homogenisieren beendet.Nachdem sich das Glas abgesetzt hatte, wurde das Homogenisat zentrifugiert und der Rückstand in wenig Puffer aufgenommen. Diese dickbreiige Suspension wurde vorsichtig in einen mit kaltem Phosphatpuffer gefüllten 100 ml - Meßzylinder gegeben, sodaß das Zellwandmaterial ganz langsam sedimentieren konnte. Nach etwa zwei Stunden hatte sich am Boden ein Satz aus verunreinigtem Zellwandmaterial gebildet. Darüber befand sich die sauberere Fraktion, eine weiße, milchig durchscheinende Schicht, die überwiegend aus kleinen Zell- und Hyphenbruchstücken bestand mit geringfügigen Verunreinigungen. Diese Schicht wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen und weiterverarbeitet. Zu 20 ml Zellwand/Puffergemisch wurden 0,5 ml 2%-tige Triton X 100 Lösung zugesetzt und 10 min unter Kühlung gerührt. Das abzentrifugierte Zellwandmaterial wurde dann solange in kaltem Phosphatpuffer gewaschen, bis keine Schaumbildung mehr erfolgte. Anschließend wurde die Zellwand in Natriumchloridlösungen gewaschen: 0,5 M, 1 M, 2 M und 3 M jeweils 10 min. Von der letzten Stufe wurde die Zellwand direkt wieder in destilliertes Wasser überführt. Durch diese Waschungen wurden sehr wirkungsvoll kleine Verunreinigungen durch Schleimstoffe oder Plasmapartikel entfernt. Hierbei erwies sich eine kurze Behandlung mit Ultraschall zu Beginn des Waschvorgangs als hilfreich.
Die saubere Zellwand wurde dann gefriergetrocknet, danach

im Porzellanmörser fein pulverisiert, mit kaltem Äther übergossen und solange in der Kälte im Mörser verrieben, bis sich an der Verdunstungszone ein gelber Belag zeigte. In der Mitte des Mörsers sammelte sich im Äther weiße Zellwand, die nach dem Verdunsten des Äthers nicht mehr klebte. 50 mg feinpulverisierte Zellwand wurde in Ampullen eingewogen und die Ampullen bis zur Verwendung der Zellwand zugeschmolzen.

2.4.2. Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der Plasmaproteine in Polyacrylamidgelen hat sich die Einrichtung der Firma ORTEC bewährt. Es handelt sich dabei um eine Auftrennung von maximal 12 Proben in einem Gel nebeneinander. Hierdurch war eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Auftrennungsergebnisse gewährleistet.

In die Kammer sind nacheinander Trenngel (7,5%, pH 8,3) bis zu einer Höhe von 6,5 cm und Sammelgel (3,5%, pH 6,9) geschichtet worden. Die Proben gelangten in Geltaschen aus Trenngel direkt auf das Sammelgel, sie wurden nicht einpolymerisiert; die Gele wurden nach den Angaben von MAURER (1968) hergestellt. 0,2 ml einer Mischung von 1 ml Proteinlösung und 0,2 ml einer 40 %-tigen Saccharoselösung waren notwendig, um saubere Trennungen zu erhalten; diese Menge entsprach einer Proteinkonzentration von 500 - 700 µg. Der Elektrophoresepuffer bestand aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (6 g), Glycin (28,8 g) pro 10 l destilliertem Wasser und wurde auf pH 8,3 eingestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 380 V und 70 mA innerhalb von 35 bis 45 min bei konstanter Pulsrate von 150 ppm. Das aus der Gelkammer herausgelöste Gel wurde in destilliertem Wasser gewaschen und mit einer Mischung aus 5 % -tiger Trichloressigsäure und 5 %-tiger Sulfosalicylsäure fixiert

(12 Stunden), danach wieder gewaschen und mit Coomassie Brillantblau R 250 innerhalb von 2 Stunden gefärbt. Um eine möglichst gleichmäßige Durchfärbung des Gels zu erhalten, empfahl es sich, das Gel während der Färbung leicht in der Lösung zu bewegen (Schüttelmaschine). Die Farbslösung bestand aus 0,25 % Coomassie, 10% Äthanol und 10% Essigsäure. Zur Entfärbung und Differenzierung wurde das Gel in warme (60°C) 10%-tige Äthanol/Essigsäuremischung gelegt und solange darin belassen, bis keine Farbwolken mehr aufstiegen. Hiernach folgte ein weiteres Bad in 3,5%-tiger Essigsäure bei Raumtemperatur. In dieser Lösung intensivierte sich allmählich die Färbung der Proteinbanden. Die Gele sind im ZEISS- DC - Densitometer bei einer Wellenlänge von 540 nm ausgewertet worden. Aus den resultierenden Kurven ist dann in der aus der Abb. 14 ersichtlichen Weise ein Pherogramm gezeichnet worden, das den Sachverhalt der Auftrennung deutlicher zeigt als die Kurven oder Fotografien der Gele selber es könnten.

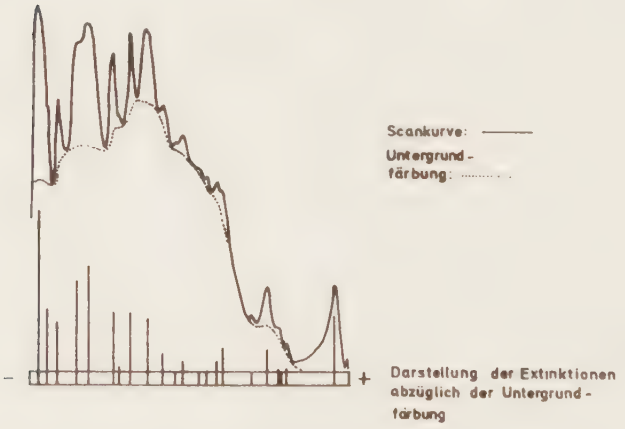


Abbildung: 14
Scankurve eines Gels (ZEISS-DC-Densitometer) und grafische Darstellung dieser Kurve als Pherogramm

2.4.3. Charakterisierung des Pigments

Das Pigment, das von B. c i n e r e a gebildet wird, ist ein Melanin (FARO, 1971), es hat ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. In Agar-Kulturen verursacht es eine Schwärzung des Nährbodens, in Flüssigmedien eine goldgelbe Verfärbung des Nährsubstrates. Zur Charakterisierung der Pigmentbildung, d.h. zur Bestimmung des Zeitpunktes steigender Pigmentsynthese und zur Bestimmung der Intensität der Pigmentbildung, sind im Verlauf der Entwicklung einer Kultur im Abstand von etwa 12 Stunden aliquote Mengen flüssigen Mediums photometrisch gemessen worden. Als Referenz diente gleichaltriges, unbeimpftes Nährmedium. Wenn die Extinktionswerte über 0,3 gegenüber den entsprechenden Anfangswerten lagen, so wurde von "Pigmentbildung" gesprochen. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit der Pigmentbildung als morphologisches Merkmal, war es nicht notwendig, eine quantitative Bestimmung der Melanine vorzunehmen.

2.4.4. Bestimmung der Tyrosinase (EC 1.10.3.1.)

a) Schnellmethode

Diese Methode eignete sich lediglich zum Tyrosinasenachweis in Kulturmedien verschiedenen Alters. Sie beruht auf einer Umkehrung des von BLAICH (1966) vorgeschlagenen Tyrosinnachweises. Das Kulturmedium wurde durch Filtration vom Mycel befreit, in Aktivkohle geschüttelt und über ein Membranfilter (SARTORIUS) gereinigt. Die farblose Probelösung wurde auf eine Serie von Hohlschliffobjektträgern getropft (pro Probelösung zwei oder dünf), wobei pro Hohlschliff nicht mehr als 0,3 ml Probelösung aufgetragen wurden. 0,3 ml einer gepufferten (pH 7) Tyrosinlösung wurden dazugegeben und das Gemisch mit einem Glasstab umgerührt, dann wurden die Proben 30 min mit UV-Licht bestrahlt und hiernach 24 Stunden in einer feuchten Kammer offen stehen ge-

lassen. Bei vorhandener Tyrosinase zeigte sich eine dunkelbraune Verfärbung der Testlösungen. Dieser qualitative Nachweis konnte auch quantitativ geführt werden, wenn eine definierte Tyrosinlösung zu den Proben gegeben wurde, wobei sich eine Konzentration von 1mg/ml bewährt hatte, und die Reaktion im Photometer bei 550 nm gemessen wurde. Für die photometrische Messung wurde das Reaktionsgemisch mit Phosphatpuffer auf 2,5 ml aufgefüllt. Die Reaktion verläuft nur bei pH 7 .

b) Photometrische Bestimmung

Zum Tyrosinasenachweis in zellfreien Zellextrakten wurde 0,1 ml Zellextrakt mit 3,9 ml eines 0,1 M Natriumphosphatpuffers (pH 6,7) vermischt und dem Gemisch 0,5 ml einer DOPA-Lösung (4 mg DOPA / ml) zugefügt. Die Proben standen für 15 min im Brutschrank bei 30°C und wurden dann bei 475 nm im Photometer gemessen. Eine"Tyrosinaseeinheit" (analog zu HOROWITZ; 1960) ist diejenige Enzymmenge, die nach 15 min einen Anstieg der optischen Dichte um den Wert 0,1 / cm Lichtdurchgang zeigt (Beispiel in Tab. 1). Bei umfangreichen Versuchsansätzen wurde die Enzymreaktion nach 15 min mit 0,1 ml einer 0,1% -tigen Natriumazidlösung gestoppt.

Probe	$E_{475\ nm}$ ohne DOPA	$E_{475\ nm}$ mit DOPA	Tyrosinase-einheiten
1	0,1	0,12	0
2	0,15	0,37	2,2
3	0,18	0,43	2,5

Tabelle: 1

Beispiel zur Ermittlung der "Tyrosinaseeinheiten"

c) Tyrosinasegehalt des festen Nährbodens

Aus Agarkulturen wurde die Tyrosinase zusammen mit allen übrigen löslichen Substanzen mit Phosphatpuffer eluiert. Hierfür wurde der Agar durch ein grobes Sieb gepreßt (Membranfilterspritze ohne Filtereinlage). Genau 2 g des feinzerkrümelten Agars wurden mit 5 ml Phosphatpuffer in der Kälte für 24 Stunden eluiert. Das abfiltrierte Eluat (SARTORIUS Membranfilter, Porengröße 1,2 µ) diente als Ausgangsmaterial für den Testansatz, der in oben beschriebener Weise (2.4.4. b) durchgeführt wurde.

2.4.5. Bestimmung von Tyrosin

Tyrosin hat nach eindimensionaler chromatographischer Auftrennung eines Aminosäuregemisches in einem Butanol/ Eisessig/ Wasser Laufmittel (4:1:1) auf Celluloseplatten (MERCK) eine Position, die von keiner anderen Aminosäure verdeckt wird. Dieser Umstand wurde für den Nachweis von Tyrosin ausgenutzt.

In einer Hydrolysereihe mit Hydrolysezeiten von 8 bis 48 Stunden ist zunächst getestet worden, bei welcher Zeit das meiste Tyrosin nachzuweisen ist. Hierbei stellte sich heraus, daß 10 Stunden Hydrolyse in 6 N Salzsäure bei 120°C unter Luftabschluß optimale Ergebnisse für Tyrosin brachten, obwohl diese Zeiten insbesondere bei Zellwandhydrolysaten nicht ausreichten, um die anderen Aminosäuren optimal aufzutrennen [1]. Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Pigmentbildung beziehen sich daher ausschließlich auf diese kurzen Hydrolysezeiten. Das Hydrolysat wurde in der gleichen Weise behandelt, wie es unter den Methoden zur Zellwandamino-

---

[1]) Die Angaben über den Tyrosingehalt sind daher nicht mit denen vergleichbar, die in den Darstellungen aller Aminosäuren im "Sterndiagramm" nach zweidimensionaler zweiphasischer Chromatographie in dieser Arbeit zu finden sind.

säureauftrennung beschrieben ist. Auf die Dünnschichtplatten wurden im Falle der Zellwandhydrolysate 10 µl und im Falle der Plasmahydrolysate 1 µl aufgetragen.

2.4.6. Übertragungsversuche

Für die Übertragungsversuche sind aus verschiedenen Zonen mehrerer 8 bis 10 Tage alter Mycelien die entsprechenden Zelltypen isoliert, gewaschen und daraus die Proteine isoliert und gereinigt worden. Ungeachtet, daß eine solche Proteinlösung, wie sie am Ende des Reinigungsvorgangs vorlag, ein Gemisch aus Proteinen und niedermolekularen Substanzen anderer chemischer Natur darstellt (Nukleotide, Zucker und sekundäre Stoffwechselprodukte), sind solche Lösungen im Übertragungsversuch eingesetzt worden. Ziel dieser Versuche war es, die morphogenetische Aktivität solcher Produkte bei bestimmten Empfängerzellen zu prüfen oder nachzuweisen. Die aus einem Spenderstamm isolierte Proteinlösung konnte zunächst als solche angesehen werden, da sie hauptsächlich Proteine enthielt. Erst nach weiteren Reinigungsschritten und Trennungen, die eine Anreicherung von nukleotidhaltigem Material bei so weit wie möglicher Abwesenheit von Proteinen zum Ziele hatten, lag der zweite Typ an Übertragungsprodukten vor, die im Folgenden als "nukleotidhaltige Fraktion" bezeichnet werden soll.

Vorbereitung der Produkte des Spenderstammes

Bei der Isolierung der Proteinfraktion ist in der oben angegebenen Weise verfahren worden, jedoch auf die Anwendung von Mercaptoäthanol im Isolierungspuffer verzichtet worden. Um besonders saubere Proteinlösungen zu erhalten, sind zwei Wege beschritten worden: 1. Fällung, 2. Fraktionierung. Die Fällung der Proteine durch konzentrierte Ammoniumsulfatlösung, machte es möglich, durch anschließendes Lösen in Isolierungspuffer, nukleotid- und zuckerfreie Proteinlö-

sungen zu erhalten. Diese Proteinlösungen waren an Reinheit in Bezug auf die erwähnten niedermolekularen Substanzen jenen überlegen, die durch Fraktionierung an Sephadex G 75 gewonnen wurden. Hierfür sind kleine Säulen von 12-15 cm Gellänge mit partikel- und schleimstoffreiem Zellhomogenat beschickt worden und mit Isolierungspuffer eluiert worden. Die ersten drei Fraktionen enthielten hauptsächlich Proteine, während die späteren Fraktionen nukleotid- und zuckerreiches Material enthielten. Die Proteinlösungen der ersten drei Fraktionen wurden vereinigt und in Collodiumhülsen in einer Unterdruckdialyse (SARTORIUS, Collodiumhülsen mit 15 nm Porengröße) eingeengt und dann im Übertragungsversuch eingesetzt. Die nukleotidhaltigen Fraktionen waren nicht konzentriert genug, um im Übertragungsversuch eingesetzt zu werden. Hierfür wurde folgende Isolierungsmethode angewendet.
Das Zellmaterial aus mindestens 30 Kulturen -aufgeteilt nach Wachstumszonen- ist in der beschriebenen Weise homogenisiert und gereinigt worden. Aus der zellpartikel- und schleimstoffreien Lösung sind die Proteine mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung ausgefällt worden und der Überstand 12 Stunden gegen Phosphatpuffer (pH 7, Zusatz von 0,1 Mol Natriumchlorid) dialysiert worden. Durch Fällung mit Äthanol konnte eine weitere Konzentrierung des nukleinsäurehaltigen Materials erreicht werden. Das Resultat dieser Fällung war stets ein gallertiger, weißflockiger Niederschlag, der sich nicht auf eine Pipettenspitze aufspulen ließ, aber leicht abzuzentrifugieren war und sich in geringer Menge 0,1 M Natriumchloridlösung löste. Diese Fraktion wurde im Übertragungsversuch eingesetzt.

In der selben Weise, wie protein- oder nukleotidhaltige Fraktionen aus Hyphen isoliert worden sind, sind auch aus dem Substrat diese Fraktionen aus verschieden alten Kulturen gewonnen worden. Es war hierbei jedoch nötig, das Substrat vorher einzuengen, was durch Zusatz von trockenem Sephadex G 50 leicht erreicht werden konnte.

Vorbereitung der Empfängerzellen
und Übertragungsversuche

Die Empfängerzellen wurden für die Übertragungsversuche zunächst in sterilem Phosphatpuffer (pH 6,5) gewaschen, allmählich auf 4°C abgekühlt und dann unter sterilen Bedingungen grob zerschnitten, zumal hierdurch ein Eindringen der isolierten Fraktionen aus dem Spenderstamm erleichtert wurde. Diese Fraktionen befanden sich zu diesem Zeitpunkt des Versuchs schon in sterilen Reagenzgläsern (2 ml pro Röhrchen). Geringe Mengen der zerschnittenen Zellen sind in diese Röhrchen gegeben worden und darin für etwa 18 Stunden belassen worden. 6 Stunden nach der Übertragung der Zellen in das Spendersubstrat sind zu 2ml des Substrats im Reaktionsgefäß 0,5 ml Vollmedium getropft worden und nach weiteren 3 Stunden nochmals 1 ml. Bei Hemmversuchen mit Puromycin ist das Antibiotikum in einer Konzentration von 50 µg/ml noch vor der Übertragung der Empfängerzellen in das Reaktionsgefäß gegeben worden. Nach etwa 18 Stunden wurde das Gemisch allmählich auf Raumtemperatur erwärmt und geringe Mengen des Zellmaterials daraus entnommen, um auf festen Nährboden geimpft zu werden. Kurzes Waschen in sterilem Puffer vor der Übertragung auf die Nährböden erwies sich als vorteilhaft, zumal dadurch bakterielle Verunreinigungen verhindert wurden.

Um die Wirkungsweise von bewachsenem Nährsubstrat zu untersuchen, sind anfänglich Festmedien verwendet worden. Die Empfängerzellen gelangten auf definierte Impfpunkte von Agarplatten, die vorher von einem entsprechenden Stamm oder dem Wildtyp bewachsen waren. Eine Cellophanfolie , die beim Erstbewuchs den Nährboden bedeckte, verhinderte das Eindringen des Pilzes in das Substrat, ermöglichte aber die Abgabe von Stoffwechselprodukten in das Medium und konnte zusammen mit dem Pilz dann vor dem Übertragungsversuch vom Medium entfernt werden. Das Medium enthielt nun an den den Wachstumszonen entsprechenden Stellen die stadienspezifischen Stoff-

wechselprodukte, die inrerseits auf die Zellen des Übertragungsmaterials wirken sollten.

Die Ergebnisse dieses Verfahrens gaben Veranlassung, das Substrat zu konzentrieren, somit also flüssiges Medium zu verwenden, in dem entsprechendes Mycel verschieden lange gewachsen war. Das Mycel wurde vor der Verwendung des Substrats entfernt, das Medium membranfiltriert (SARTORIUS - Membranfilter, Porengröße 0,2 µ) und in sterile Reaktionsgefäße gegeben (Zentrifugen- oder Reagenzgläser). In das so vorbereitete Substrat wurden die Empfängerzellen in der oben beschriebenen Weise eingeimpft. Erfolgte keinerlei Reaktion bei den Empfängerzellen, so wurde das membranfiltrierte Substrat über eine Unterdruckdialyse eingeengt. Hierzu hat sich die Vorrichtung der Firma SARTORIUS bewährt, bei der in einem Cellulose-Nitratröhrchen definierter Porengröße verdünnte Proteinlösungen konzentriert werden können. Die eingeengten Substrate wurden unverdünnt sowie in einer Verdünnung von 1:1 und 1: 10 in Übertragungsversuchen eingesetzt. Das eingeengte Substrat wurde mit frischem , unbewachsenem Vollmedium verdünnt.

Das in protein- und nukleotidhaltige Fraktionen aufgetrennte Substrat gelangte in der gleichen Weise zur Anwendung, wie die aus Zellmaterial gewonnenen Fraktionen. Die Trennung in proteinhaltige und nukleotidhaltige Fraktionen erfolgte nach den Angaben auf S. 34 .

2.4.7. Isolierung der Kerne und Auftrennung der Kerne im Dichtegradienten

Die Isolierung der Kerne aus frischem Mycel (nicht älter als 4 Tage) erfolgte nach den Angaben von DUFFUS (1969). Da DUFFUS seine Untersuchungen an S c h i z o s a c c h a r o m y c e s gemacht hat, mußte die Methode etwas modifi-

ziert werden.
Das Zellmaterial wurde in Phosphatpuffer (pH 7) gewaschen und in einer Lösung aus 1 M Sorbit mit einem Zusatz von 20 % Glycerin im VIRTIS-Homogenisator für 3 min mit Messern homogenisiert (4°C). Das Homogenisat wurde durch kurzes Zentrifugieren in der CHRIST- Minifuge (5min 2000 Upm) von grobem Zellbruch befreit. 2 ml des Überstandes wurden auf einen Stufengradienten gelegt, der aus 4 M, 3 M, 2 M und 1 M Sorbitlösungen bestand. Nach 20 min Zentrifugieren bei 25 000 Upm (BECKMANN Ultrazentrifuge, Rotor SW 41) lagen die Kerne auf der 4 M Sorbitlösung (DUFFUS, 1969). Die Kernfraktion wurde mit 2 Volumen kaltem destilliertem Wasser verdünnt, bei 2 650 Upm in der CHRIST-Minifuge 10 min zentrifugiert, das Pellet in 0,5 M Sorbitlösung resuspendiert und in einem POTTER-Homogenisator vorsichtig bewegt. Das Gemisch wurde nochmals bei 2 650 Upm sedimentiert und die geschilderten Prozesse solange wiederholt, bis der Überstand nach dem Zentrifugieren klar blieb. Die letzte Waschung der Kerne wurde in 1 %-tiger Essigsäure vorgenommen.

Aus einer 4 M und einer 2 M Sorbitlösung wurde mit Hilfe des Gradientenmischers ULTROGRAD von der Firma LKB ein isokinetischer Gradient hergestellt. Seine Form ist in den Abbildungen 19 a —c (Seite 62) als gestrichelte Kurve dargestellt; es handelt sich um die Brechungsindizes der einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen des Dichtegradienten wurden mit Hilfe einer Austropfanlage (nachgebaut aus den Angaben der Firma LKB) gewonnen. Jede Fraktion bestand aus 5 Tropfen.

Auf die Dichtegradienten wurden 0,5 - 1 ml der gewaschenen Kernsuspension geschichtet und in der BECKMANN-Ultrazentrifuge (Rotor SW 41) für 30 min bei 25 000 Upm zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen (10 Tropfen/Frakt.) wurden mit der Austropfanlage gewonnen und gelangten in eine gekühlte Vorlage mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 7). Die Extinktion bei 254 nm

ist im BECKMANN Photometer bestimmt worden.

2.4.8. Versuche mit Puromycin

Für Hemmversuche mit Puromycin wurde aus einer dichten Sporensuspension eine Verdünnungsreihe hergestellt und aus jeder einzelnen Stufe die Sporenzahl in der Thomakammer bestimmt. Hierdurch ließ sich bestimmen, wie die Ausgangssuspension verdünnt werden mußte, um zu einer Sporenzahl von 10/ ml zu gelangen. In 10 sterile Reagenzgläser mit je 2 ml Vollmedium wurden je 1 ml mit 10 Sporen aus der entsprechenden Verdünnungsstufe einpipettiert. Nach etwa 8 Stunden begannen die Sporen zu keimen. Zu diesem Zeitpunkt wurde den Sporensuspensionen aus einer Puromycin-Stammlösung (2 mg/ml) 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml .....0,8 ml zugegeben und die gesamte Flüssigkeitsmenge im Reagenzglas mit Medium auf 4 ml aufgefüllt. (Puromycinkonzentrationen in den einzelnen Stufen: von 50 µg/ml bis 400 µg/ml). Nach weiteren 10 Stunden wurden die jungen Mycelien herunterzentrifugiert, kurz mit Puffer gewaschen und auf Nährböden geimpft. Aus jedem Ansatz wurden die Wachstumsraten der Hyphen bestimmt und damit festgestellt, welche Puromycinkonzentration das Wachstum gerade noch gestattete. Aus diesem Ansatz wurden die Mycelien einzeln isoliert und auf neue Agarplatten geimpft. Nach 10 bis 14 Tagen Wachstum wurden die Kulturen miteinander verglichen und auf morphologische Veränderungen gegenüber der Kontrolle untersucht.

Um die Pigmentbildung nach Puromycinbehandlung zu messen, sind die behandelten Keimmycelien in Flüssigmedium geimpft worden. Jeden zweiten Tag wurde mit einer Probe dieses Mediums die Pigmentbildung photometrisch bestimmt und ein Peroxidasenachweis geführt.

2.4.9. Bestimmung der Zellwandpermeabilität vor und nach der Behandlung mit Puromycin

Fluoreszenzfarbstoffe, wie Acridinorange, dringen bei niedriger Farbstoffkonzentration sehr langsam in die Zelle ein und färben bestimmte Organellen intensiv an. Dieser Vorgang läßt sich dann im Fluoreszenzmikroskop beobachten, wenn die Konzentration des Farbstoffs und die Versuchsbedingungen auf das Untersuchungsobjekt genau abgestimmt werden.

Bei B. c i n e r e a erwies sich eine Acridinorange-Verdünnung von etwa 1: 12 000 bis 1 : 15 000 in Phosphatpuffer (pH 6,3) oder Leitungswasser als günstig, um beobachten zu können, wie der Farbstoff in die Zellen eindringt. Der Zeitraum, der von der ersten Berührung der Hyphen mit dem Farbstoff bis zur ersten Fluoreszenz im Inneren der Hyphen verging, wurde als Maß für die Permeabilität der Zellwand genommen. Es mußte darauf geachtet werden, daß lediglich Organellen (Kerne, Nucleoli oder Vakuolen) fluoreszeierten und nicht die ganze Hyphe, was eine zu hohe Konzentrierung des Farbstoff in den Hyphen anzeigen würde. Die geeignete Verdünnung von Acridinorange war dann erreicht, wenn etwa 20 bis 40 sek genügten, um lediglich die Organellen oder Einschlußkörper in den Hyphen zum Fluoreszeieren zu bringen. Die genaue Verdünnung von Acridinorange mußte bei jedem Versuch mit einem neuen Stamm erst ermittelt werden, da sich die Zellwände der Stämme in ihrem Aufbau zum Teil erheblich unterschieden und auch das Alter des Untersuchungsmaterials die Zellwandpermeabilität beeinflußt. Die Messung der Permeationszeit wurde auf zwei Weisen vorgenommen:

a) Wenige Hyphen wurden auf einen trockenen Objektträger gelegt, auf dem Objekttisch des Fluoreszenzmikroskopes die erprobte Verdünnung von Acridinorange zum Präparat getropft, dieser Zeitpunkt gestoppt und das Präparat solange beobachtet, bis die erste kräftige Fluoreszenz im Zellinneren zu erkennen war. Die Zeit, die bis zu dieser Reaktion verstrich, galt als

Maß für die Permeabilität der Zellwand.

b) Eine zweite Art, die Permeabilität der Zellwand einer unbehandelten Hyphe mit einer Puromycin-behandelten zu vergleichen, ging von einer Serie von Meßwerten für die Permeationszeit von unbehandelten Hyphen gleichen Alters aus. Aus dem Mittelwert dieser Ergebnisse wurde ein Zeitpunkt t_1 = n sek festgesetzt, zu dem bei der unbehandelten Zelle der Farbstoff eingedrungen ist. Die behandelten Zellen wurden für eine Zeit von t_2 = n - 15 sek im Farbstoff belassen und dann mikroskopiert. Nur dort, wo nach t_2 schon eine intensive Fluoreszenz der Organellen vorhanden war, konnte eine erhöhte Zellwandpermeabilitat angenommen werden.

2.4.10. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien oder Stämme wurde B. c i n e r e a auf Cellophanfolie kultiviert, die entsprechenden Regionen ausgeschnitten und von der Folie abgepinselt. Nach gründlichem Waschen des Mycels in Phosphatpuffer pH 7,4 folgte die Fixierung in Glutaraldehyd (1 h,22°)(2,5 ml 70%-tiges Glutaraldehyd in 67,5 ml Phosphatpuffer). Das Fixierungsmittel wurde mit Phosphatpuffer ausgewaschen und das Material in 2%-tige Osmiumtetroxidlösung übertragen, der pro 25 ml 10 ml Veronal-Acetat-Puffer, 3,6 ml Natriumchloridlösung (8,4 %-tig) und 11 ml 0,1 N Salzsäure zugesetzt waren. Die Dauer der Fixierung betrug 1 h bei 4°. Nach dem Waschen gelangte das Material in 20%-tiges Äthanol, dann in 30%-tiges, es wurde jeweils für 30 min darin belassen. Bei Schimmelpilzen gelingt die Kontrastierung am besten, wenn während der Entwässerung eine alkoholische Uranylacetatstufe (0,5 % Uranylacetat in 50%-tigem Äthanol) eingesetzt wird (THIELKE, persönliche Mitteilung). Die Dauer der Kontrastierung betrug

2 Stunden (24°C). Hiernach wurde das Material schonend zu Ende entwässert und schließlich über eine Propylenoxid/Eponreihe in reines Epon überführt und darin eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Ultramikrotom der Firma Reichert angefertigt. Als Elektronenmikroskop stand das Gerät der Firma Siemens "Elmiskop I" zur Verfügung.

Gegenüber der chemischen Fixierung und Präparation ist die Wahrscheinlichkeit der Artefaktbildung bei der Gefrierätzungsmethode wesentlich geringer. Gefrierschneiden und Bedampfen der geätzten Schnittflächen mit Pt-C erfolgte nach den Angaben von MOOR et al. [1]) (1961) in einer Anlage der Firma Balzers. Die Replica der Schnittoberflächen wurden durch Waschen in Eau de Javelle, 70%-tiger Schwefelsäure und Wasser von Zellresten gereinigt und dann auf unbefilmte Cu-Netze übertragen.
Für die Gefrierätzung sind sowohl unfixierte als auch fixierte Hyphen, Konidien, Sklerotien und Mycelstücke verwendet worden. Konidien und Sklerotien ließen sich unfixiert gut untersuchen. Junges Mycel mußte nach den oben angegebenen Methoden mit Glutaraldehyd fixiert werden.

---

[1]) Moor,H., K. Mühlethaler, H. Waldner und A. Frey-Wyssling (1961): A new freezing ultramicrotome.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 10, 1 - 13.

3. Ergebnisse

Seit langem ist bekannt, daß B. c i n e r e a in einer Vielzahl von Varianten vorkommen kann. So haben HANSEN und SMITH (1932) aus 300 Isolaten 123 morphologisch verschiedene Varianten unterschieden. 47 Kulturen enthielten morphologisch unterschiedliche Typen, wenn sie von Konidien her weiterkultiviert wurden. Die Ursache für eine solche morphologische Vielfalt ist primär in der Vielkernigkeit der Konidien zu suchen, die dadurch entsteht, daß während der Konidienbildung eine beliebige Anzahl von Kernen in die Sporenanlage geschleust werden, sodaß eine heterokaryotische Einheit entsteht. Die hohe Variabilität des Phänotyps und das häufige Auftreten von Anastomosen mit anschließender Mischung des Kernbestandes der beteiligten Mycelien werden als sichere Hinweise für das Vorliegen eines Heterokaryonten gewertet.

Es ist gleichgültig, ob man annimmt, daß der Organismus ursprünglich in mehreren homokaryotischen Varianten vorgelegen hat und erst durch Hyphenverschmelzung heterokaryotisch geworden ist, oder ob die Heterokaryose das Ergebnis einer epigenetischen Beeinflussung war (HANSEN und SMITH, 1932), in beiden Fällen sollte es möglich sein, wieder homokaryotische Mycelien heranzuzüchten. In der vorliegenden Arbeit war dies eine Voraussetzung für die Untersuchung von morphogenetischen Vorgängen, zumal sich diese Vorgänge physiologisch nur dann exakt charakterisieren lassen, wenn einheitliches (homogenes) Material vorliegt. Ebenso lassen sich nur dann Aussagen zur Vielkernigkeit machen, wenn morphologisch unterscheidbare homokaryotische vielkernige Organismen als "Stämme" vorliegen, die sich dann auch biochemisch miteinander vergleichen lassen.

3.1. Isolierung von Stämmen

Grundlage für die Isolierung von Stämmen war zunächst eine detaillierte Kenntnis des Organismus und seiner Eigenschaften. Die drei Wildtypen sind auf verschiedenen Nährböden über mehrere Generationen hin miteinander verglichen worden, bevor sie zur Stammisolierung eingesetzt wurden. Hierzu gehörte neben der Aufnahme von Wachstumsraten für Einspor- und Vielsporkulturen (Abb.15) auch der Vergleich der Eigenschaften und deren Kopplung.

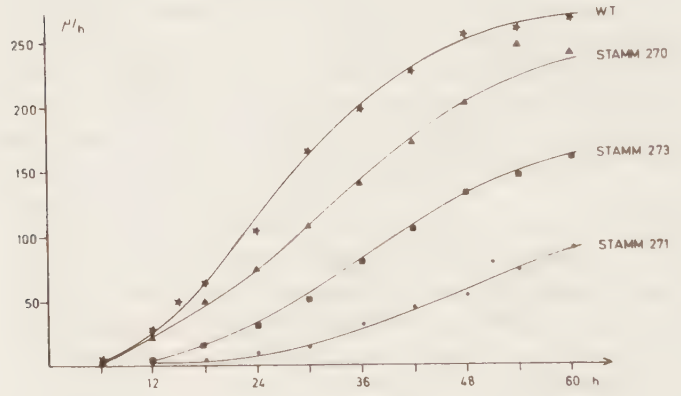


Abbildung: 15 Wachstumsraten von Einsporkulturen

Tab.2 zeigt, daß bei 1440 miteinander verglichenen Einsporkulturen des Wildtyps eine relativ einheitliche Verteilung der prägnantesten Merkmale zu beobachten war. Der hohe Anteil von Kulturen ohne Sklerotien ist auf einen zu früh angesetzten Zeitpunkt der Auswertung zurückzuführen: normalerweise bilden die Wildtypen zu mindestens 40 - 60 % auch Sklerotien.
Tab.3 zeigt ein ähnliches Bild. Es fällt lediglich auf, daß

Sklerotienbildner auch meistens Konidien tragen und daß ihnen in den seltensten Fällen Pigmente fehlen.
Eine Stabilität der Eigenschaften über mehrere Generationen besteht bei einer Einsporkultur aus dem Wildtypmaterial nur sehr selten.

Merkmal	n /1440	%
Kulturen ohne Konidien	352 /1440	24,4 %
Kulturen mit Konidien	368 /1440	24,2 %
Pigmentbildner	370 /1440	25,6 %
keine Pigmentbildner	350 /1440	25,0 %
Sklerotienbildner	280 /1440	19,4 %
keine Sklerotienbildner	895 /1440	62,1 %

Tabelle 2

Aus insgesamt 1440 Einsporkulturen (Wildtyp) ist die Verteilung der wichtigsten Eigenschaften ohne Berücksichtigung von gekoppelten Merkmalen aufgeschlüsselt.

Merkmal-kombination	n	%
Konidien + / Pigment +	450	31 %
Konidien + / Pigment -	285	20,1 %
Konidien - / Pigment +	290	19,7 %
Konidien - / Pigment -	415	28,8 %
Sklerotien + / Konidien +	255	17,7 %
Sklerotien + / Konidien -	40	2,7 %
Sklerotien - / Konidien +	480	33,3 %
Sklerotien - / Konidien -	655	46,1 %
Sklerotien + / Pigment +	255	17,7 %
Sklerotien + / Pigment -	35	2,4 %
Sklerotien - / Pigment +	490	34,3 %
Sklerotien - / Pigment -	660	45,3 %

Tabelle 3: Kopplung der wichtigsten Eigenschaften Je Gruppe auf 1440 Einsporkulturen (Wildtyp) bezogen.

Licht beeinflußt nach eigenen Untersuchungen (KOWALSKI, 1971) die Teilungshäufigkeit der Kerne. Konidien- und Sklerotienbildung sind lichtunabhängig. Bei Dauerlicht konnte eine Steigerung der Pigmentsynthese beobachtet werden (Abb. 16) Die dargestellten Ergebnisse wurden undeutlicher, je höher der Sporentiter einer Impflösung war.

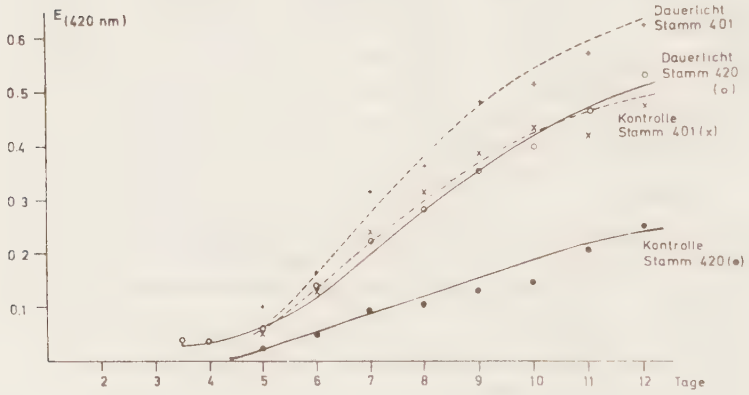


Abbildung: 16

Pigmentbildung bei Dauerlicht
Stamm 420 gegenüber einer Kontrolle (Licht/Dunkel-Wechsel im 12 Stunden Rhythmus)

Einige morphogenetische Prozesse, wie insbesondere die Keimung, die Pigment-, die Sklerotien- und die Konidienbildung lassen sich bei einigen Pilzen durch Nährbodenzusätze oder Änderungen der Lichtverhältnisse fördern oder induzieren (LEONINAN und LILLY, 1940; LILLY und BARNETT, 1949; KRICHEVSKY und WRIGHT 1963; AINSWORTH und SUSSMAN 1966). In später darzustellendem Zusammenhang wird deutlich werden, daß auch die Kenntnis von der Induzierbarkeit solcher Prozesse von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der isolierten Stämme ist, sodaß bei den Wildtypen an Einspor- und Vielspormycelien insbesondere die Induzierbarkeit der Konidien- und Pigmentblidung geprüft wurde.
Wie Tab. 4 zeigt, besteht mit dem von MILLER (1955) empfohlenen V 8 - Gemüsesaft Agar die Möglichkeit, Konidienbildung zu induzieren.

Material	Zeitpunkt der ersten Konidienbildung		
	Vollmedium	V 8 Agar	Vollmedium mit V 8 Saft
verarmte Kulturen:			
Einsporkultur	--	--	--
10 Kon./0,1 ml	--	--	--
100 " /0,1 ml	--	--	--
500 " /0,1 ml	--	8. Tag	8. Tag
normale Kulturen: (WT 3)			
Einsporkultur	8. Tag	7. Tag	6. Tag
10 Kon./0,1 ml	8. "	7. "	6. "
100 " /0,1 ml	7. "	6. "	6. "
500 " /0,1 ml	6. "	6. "	5. "
Stamm 271			
Einsporkultur	10. Tag	10. Tag	10. Tag
10 Kon./0,1 ml	10. "	9. "	7. "
100 " /0,1 ml	8. "	6. "	6. "
500 " /0,1 ml	6. "	8. "	5. "

Tabelle: 4 Induktion der Konidienbildung mit Nährstoffzusätzen (insbesondere V 8 - Saft)

3.1.1. Heterokaryosetests und Reduktion der Heterokaryose

Als weitere Grundlage für die Stammisolierung ist der Grad der Heterokaryose bestimmt worden. Eine größere Anzahl von Einsporkulturen (minimal 30) gleicher Herkunft wurden auf Normalmedium ausplattiert und nach zwei Wochen miteinander verglichen. Alle Kulturen, die gleiche Merkmalskombinationen aufwiesen, wurden zu Gruppen zusammengestellt und ausgezählt. War der Grad der Heterokaryose besonders hoch, so bedeutete dies, daß es immer wesentlich mehr Merkmalskombinationen gab, als bei niedrigem Heterokaryosegrad und sich nur eine oder gar keine Eigenschaftskombination besonders deutlich hervorhob.
In der Tab. 5 sind die Bestimmungen des Heterokaryosegrades bei den drei Wildtypen aufgeführt. Von 54 Kulturen des WT 1 zeigten 25 (= 46,2 %) Konidienbildung und pigmentiertes Mycel, bei 10 Kulturen fehlte die Pigmentbildung bei deutlicher Sporulierungstätigkeit (= 18,5 %) und Ansätzen für Sklerotien. Letztere fehlten bei 10 anderen Kulturen (= 18,5 %). 11,2 % der Kulturen fielen durch ein rauhes Mycel auf und sonderten sich damit von einer einzigen Kultur (= 1,8 %) ab, die glattes, weißes und pigmentfreies Mycel ohne Konidien aufwies. Für die Aufstellung der Tabellen war es unwichtig, welche Merkmalskombinationen bei den einzelnen Gruppen gezählt wurden, es ging hier lediglich um die Anzahl der Gruppen und deren Größen.

WT	Kulturen insgesamt	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination				
1	54	46,2	18,5	18,5	11,2	1,8
2	77	39	30,5	23,6	4,2	2,8
3	64	34,2	26,6	24,5	11	4,7

Tabelle:5 Heterokaryose der Wildtypen

Nimmt man an, daß die Kultur, die als einzige eine ganz bestimmte Merkmalskombination aufweist, eine Kultur mit homogenen Eigenschaften ist, so unterliegt man einer Täuschung, denn es zeigt sich schon oft nach der ersten oder zweiten Uberimpfung dieser Kultur, daß sich die Kopplung der festgestellten Eigenschaften nicht wiederholt.
Die Herstellung von Stämmen mit möglichst homogenem Kernmaterial sollte somit bei der Reduktion der hohen Kernzahlen der Konidien beginnen.

THREEFALL (1971) hat festgestellt, daß eine Behandlung mit Nitrosoguanidin keimende Konidien von B o t r y t i s a l l i i in der Weise beeinflußt, daß die Keimschläuche einkernig wurden. Der Autor spricht solche Kulturen als homogenes Kulturmaterial an. Diese Methode ist wegen der mutagenen Wirkung der Chemikalie auf den Organismus für diese Arbeit nicht angewendet worden.

Aus eigenen Untersuchungen (KOWALSKI, 1971) war bekannt, daß die Mitose in den Spitzenzellen stark temperatursensibel ist. Dieses Verhalten sollte nun genutzt werden: während der Keimung sind die Sporen kurzen aufeinanderfolgenden Temperaturschocks ausgesetzt worden. Die Wachstumsraten der so behandelten Kulturen lagen in den meisten Fällen wesentlich unter denen der Kontrollen (Abb.17). Die Kernzahlen temperaturgeschockter Keimmycelien waren deutlich niedriger als die der unbehandelten (Tab. 6). Diese Reduktion reichte jedoch nicht aus, um daraus phänotypisch über mehrere Generationen hin gleichbleibendes Material zu gewinnen: immer wieder wurde deutlich, daß durch die Temperaturschocks nur wenige Mitosen in der keimenden Spore unterblieben. Sinnvoll wäre eine Behandlung erst dann, wenn nur möglichst wenigkernige Konidien von der Vielzahl der vielkernigen Konidien abgetrennt werden könnten und dann nur diese mit Temperaturschocks behandelt werden würden. So würden nur noch ein oder maximal zwei Kerne in die Keimhyphe gelangen. RICHMOND und PRING (1971) und GULL und PRINCI (1971) geben

Hinweise dafür, daß nach dem Eindringen der in Mitose befindlichen Konidienkerne in die Keimhyphe sofort eine Querwand zwischen Keimhyphe und Spore gebildet wird und die Spore allmählich vakuolisiert. Die Kerne der Keimhyphe bestimmen somit den genetischen Informationsgehalt des Organismus. Es sollte demzufolge gelingen, möglichst wenigkernige Konidien zu sammeln und diese den Temperaturschocks auszusetzen.

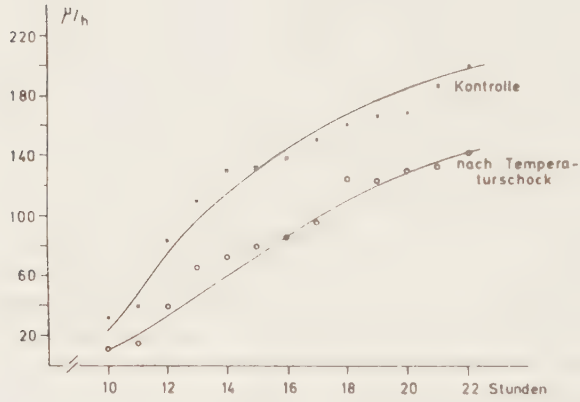


Abbildung: 17: Wachstumsraten nach Temperaturschocks; (jeweils Einsporkulturen).

Kernzahlen der Konidien und der Keimhyphen mit und ohne Temperaturschock				
Versuch	Anzahl der Zählungen n	Kernzahl Konidien ($\bar{n}$)	Kernzahl 1. Hyphe ($\bar{n}$)	Kernzahl nach Temp.Schock (1. Hyphe) ($\bar{n}$)
1	22	9,4	5,6	3
2	26	6,4	4	3,1
3	26	14	10,7	8
4	26	7,2	6	3,1
5	26	7,6	5	4
6	67	7,9	5,1	3,8
7	30	6,4	4	2,7
8	34	8,2	8,2	7,5

Tabelle: 6

Über einen Saccharose-Stufengradienten (50 %, 30 %, 10 % und 3 %) sind gewaschene Sporenmassen aufgetrennt worden. Der Hauptanteil der Sporen lag nach dem Zentrifugieren bei 1 000 Upm für 20 min auf der 50 % - Stufe. Ausmaße und Kernzahlen der Sporen dieser und der übrigen Fraktionen sind in Tab. 7 a - c zusammengestellt.

Ausmaße der Sporen aus einzelnen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten				
Stufe:	50%	30%	10%	3%
Anzahl der Messungen:	19	19	16	19
Durchmesser in µ:	15,4	15,6	16,0	12,7
(Quellzeit der Sporen: 30 min Messung: größter Durchmesser)				

Tabelle: 7 a

Kernzahlen der Sporen aus einzelnen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten				
Stufe:	50%	30%	10%	3%
Anzahl der Messungen:	14	14	14	40
Kernzahlen (Mittelwerte):	9,3	7,5	6	2,5

Tabelle: 7 b

Heterokaryosegrad der Sporen aus einzelnen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten						
Stufe	Anzahl der Kulturen	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination				
50%	51	29,4	17,6	21,6	15,7	17,6
30%	30	30	20	16,7	16,7	16,7
10%	30	30	30	13,6	13,6	13,6
3%	51	25,5	13,7	11,8	9,8	7,8

Tabelle: 7 c

In den beiden obersten Stufen des Gradienten wurden die wenigkernigen Konidien nachgewiesen. Der Heterokaryosegrad war wesentlich reduziert, wie Tab. 7 c zeigt. Diese Reduktion reichte jedoch nicht aus, um einheitliche Stämme zu isolieren. Erst nach Anwendung der Temperaturschocks zeigte sich eine deutliche Verringerung der Varianz von Einsporkulturen über mehrere Generationen hin (Tab.8). Die Temperaturschocks wurden so gegeben, daß zunächst eine leichte Stimulierung der Keimung durch kurz aufeinanderfolgende Schocks erreicht wurde: 10 min 30°C, 10 min 4°C und nochmals 10 min 30°C. Dann erst wurde nach etwa 2-4 Stunden die keimende

Isolate	Kernzahl der Konidien	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination			
32	1	85	15		
72	2	90	7	3	
84	3	69	18	12	4
84	4	76	20	4	
49	5	49	37	12	4
16	6	44	31	19	6

ohne Temperaturschock

Isolate	Kernzahl der Konidien	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination		
56	2	93	5	
86	3	84	14	2
71	4	80	17	3
42	5	50	40	10
12	6	42	42	16

mit Temperaturschock

Tabelle: 8
Varianz bei Kulturen aus wenigkernigen Konidien mit und ohne Temperaturschock
(Einkernige Konidien sind nach einem Temperaturschock nicht keimungsfähig)

Spore jeweils eine Stunde bei 38°-40°C und eine Stunde bei 4°C in drei- bis viermaligem Wechsel belassen. Die geeigneten Zeiten und Temperaturen sind durch Serienversuche ermittelt worden (Tab. 9).

Einfluß der Temperaturschocks auf die Keimungsrate

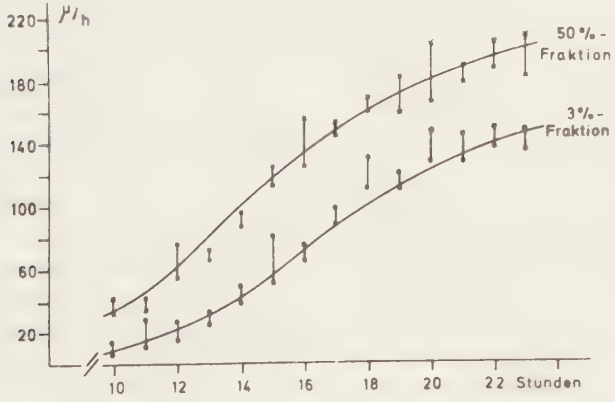
	30'30°	30'35°	30'40°	30'45°
Sporentiter pro Platte	55	55	55	55
Anzahl der Platten	20	20	12	11
gekeimte Sporen in %	93	87	70,5	65,5

	60'35°	60'45°	60'38° + 60' 4°
Sporentiter pro Platte	55	55	37
Anzahl der Platten	16	17	15
gekeimte Sporen in %	71	25	91

	2 x (60'38°+60' 4°)	3 x (60'38°+60' 4°)
Sporentiter pro Platte	37	37
Anzahl der Platten	14	16
gekeimte Sporen in %	90	73

Tabelle: 9

Auch bei Weiterkultivierung war nun bei den behandelten Kulturen eine Stabilität der Eigenschaften zu verzeichnen. Die Wachstumsraten der behandelten Einsporkolonien lagen in der ersten Generation wesentlich unter denen der Kontrollen: es besteht somit ein direkter Zusammenhang zwischen Kernzahl und Wachstumsrate, was für die Beurteilung der Kernverhältnisse einer keimenden Spore sehr vorteilhaft war. Aus der obersten Fraktion des Dichtegradienten mit einer aufgetrennten Konidiensuspension sind die Kernzahlen von etwa 50 Konidien bestimmt und mit den Wachstumsraten verglichen worden. Die unterste Fraktion des Dichtegradienten enthielt Sporen mit mindestens 10 Kernen, die Wachstumsraten dieser Mycelien lagen wesentlich höher als die der wenigkernigen Konidien aus der 3% - Fraktion (Abb.[18]).



WACHSTUMSRATEN VON EINSPORKULTUREN
AUS DEM DICHTEGRADIENTEN
(leichteste und schwerste Fraktion)

Abbildung: 18

3.1.2. Das Ergebnis der Stammisolierung

Als "Stamm" wird schließlich eine aus dem heterokaryotischen Wildtyp isolierte phänotypische Variante bezeichnet, die aus einer ein- oder maximal zweikernigen Spore entstanden ist und über mehrere Generationen hin die gleichen Eigenschaften hat.

In der Tab.10 sind die wichtigsten Stämme aufgenommen. Ihre Stammnummer erhielten sie nach der Reihenfolge der Isolierungsversuche. Die Eigenschaften der einzelnen Stämme sind so verteilt, daß sich jetzt stadien- und stammspezifische Unterschiede biochemisch charakterisieren lassen. Die Stämme 260, 261, 273 und 283 waren geeignet, die Kopplung von Pigment- und Konidienbildung zu untersuchen. Die bei diesen Stämmen gewonnenen Ergebnisse konnten mit Hilfe weiterer Stämme gleicher Merkmalskombination aber anderer Herkunft verglichen und abgesichert werden: 301, 311 und 401.

Besonders hervorzuheben ist, daß durch die Behandlung der Sporen mit Temperaturschocks nicht etwa temperatursensible Mutanten isoliert worden sind, und zwar aus folgenden Gründen: Nach der Auftrennung im Dichtegradienten sind nur 50 bis 60 Einsporkolonien aus der leichtesten Fraktion weiterkultiviert worden. In den meisten Fällen gelang es, mindestens drei Kulturgruppen mit unterschiedlichen Merkmalskombinationen zu gewinnen. Dieses Zahlenverhältnis spricht gegen eine Induktion von Mutanten. Weiterhin tragen die Stämme Eigenschaften, die im Wildtyp einzeln zwar nur schwer erkennbar aber potentiell immer vorhanden sind. Im Verlauf der Isolierungsarbeiten sind jedoch auch Mutanten isoliert worden: eine Farbstoffmutante, die das Medium rot pigmentiert und eine sterile Mutante, die zwar Ansätze zur Konidienbildung zeigte, deren Konidienträger jedoch in ein spitz zulaufendes, nicht mehr weiterwachsendes Hyphengeäst münden. Damit sei betont, daß die vorliegende Arbeit von ganz anderen Voraussetzungen ausgeht als die Untersuchungen von HOROWITZ et al. (1960) und FLING et al. (1963).

S T A M M T A F E L

(Tabelle 10)

	Wildtyp 1	Stamm 260	Stamm 261	Stamm 270	Stamm 271	Stamm 273	Stamm 283	Stamm 291	Wildtyp 2	Stamm 301	Stamm 311	Stamm 354	Stamm 396	Wildtyp 3	Stamm 401	Stamm 420	Stamm 435	Stamm 436
Mycel																		
weiß		●	●	●			●			●				●			●	
grau	●				●	●		●	●		●	●	●		●	●		●
glatt		●	●		●	●				●						●	●	
rauh	●			●			●	●	●		●	●	●	●	●			●
leicht wirbelartig								●		●							●	
Konidien																		
hell/braun					●						●		●			●		
fast schwarz	●						●	●	●					●	●			●
rhythmisch							●		●		●							
nicht rhythmisch	●				●									●	●	●		●
üppig	●						●		●		●			●	●			
weniger üppig bis schwach					●							●	●			●		●
keine Konidien		●	●	●		●				●			●				●	
Hyphen																		
dünn	●	●	●	●	●	●	●		●		●		●	●		●	●	
breit, knorrig	●							●	●	●		●		●	●			●
Pigmentbildung																		
schwarz	●	●				●	●		●				●		●	●		
hellbraun					●					●							●	●
rhythmisch					●				●									●
teilweise								●					●					
nicht vorhanden			●	●							●	●		●				
Peroxidaseabscheidung (infektiös)	●				●	●	●			●		●				●	●	
Sklerotien																		
große	●					●	●	●	●		●		●	●				●
klein u. zahlreich															●			
keine		●	●	●	●					●						●	●	
rhythmische Sklerotienbildung	●							●			●			●				●

3.1.3. Überprüfung der Stämme

Die einzelnen Stämme sind vor weiteren Untersuchungen daraufhin getestet worden, ob sich die fehlenden Eigenschaften eventuell induzieren lassen und ob sich das "dualistische Phänomen" nachweisen läßt, wonach sich Mycel- und Konidientypen voneinander unterscheiden (HANSEN und SMITH, 1932).

Induktion der Pigmentbildung

Beim Wildtyp war es möglich, mit intensivem Dauerlicht eine verfrühte Pigmentbildung auszulösen. Nur in wenigen Fällen ließ sich bei den pigmentfreien Stämmen die Pigmentierung durch pH-Änderungen induzieren (Diffusionstest). Die Stämme 261 und 270 reagierten im alkalischen Bereich des Nährbodens mit schwacher Pigmentbildung.

Induktion der Konidienbildung

Bei allen Stämmen, die keine Konidien mehr bildeten und in den ersten fünf Generationen einen niedrigen Heterokaryosegrad aufwiesen, ließ sich die Konidienbildung auch nicht mehr induzieren. Besonders zuverlässig war der Test mit V 8 Agar, der auch bei völlig verarmten Kulturen des Wildtyps zur vollen Regeneration führte. Malzinzusätze haben sich nicht bewährt.

Das dualistische Phänomen

Die Tab.11 verdeutlicht, in welcher Weise dieser Test durchgeführt worden ist. Aus einer Ausgangskultur je Kondienbildner sind sowohl Konidien als auch Mycel weiterkultiviert worden und je nach Eigenschaftskombination nach jeder Generation wieder Konidien und Mycel weitergeimpft worden. Dieser Test lohnte sich nur dann, wenn Zweifel über die Homogenität eines Stammes bestanden. Er ließ sich nur bis zur fünften Generation durchführen, da die Mycelüberimpfungen leicht zu Verarmungen der Kulturen führten und damit das Ergebnis verfälschten. Die in der Tab.12 dargestellten Ergebnisse zeigen aber, daß bei den verwendeten B o t r y t i s - Stämmen das dua-

listische Phänomen im Sinne von HANSEN und SMITH (1932) nicht zu beobachten war.

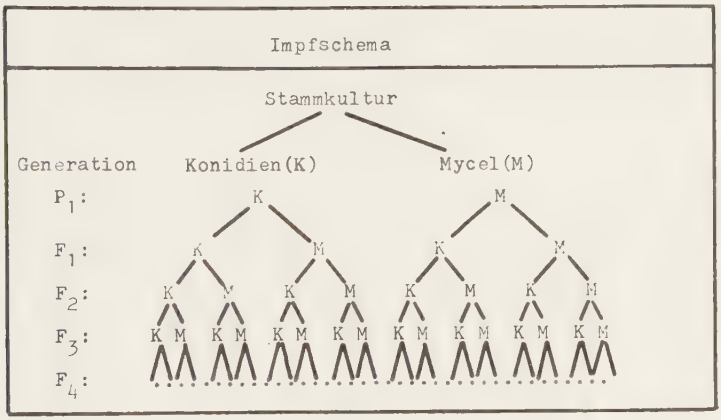


Tabelle: 11

Stamm	Generation	Kulturen insgesamt	Kulturen mit gleichen Merkmalen als die der Stammkultur	Kulturen mit anderen Merkmalen als die der Stammkultur
271	F_1	20 (K) 20 (M)	20 20	
	F_2	40 (K) 40 (M)	33 39	7 1
	F_3	80 (K) 80 (M)	77 73	3 7
	F_4	160 (K) 160 (M)	152 142	8 18

Tabelle: 12 (Stamm 271)

Stamm	Generation	Kulturen insgesamt	Kulturen mit gleichen Merkmalen als die der Stammkultur	Kulturen mit anderen Merkmalen als die der Stammkultur
311	F_1	20 (K) 20 (M)	20 20	
	F_2	40 (K) 40 (M)	40 40	
	F_3	80 (K) 80 (M)	72 78	8 2
	F_4	160 (K) 160 (M)	147 158	3 2
401	F_1	20 (K) 20 (M)	19 19	1 1
	F_2	40 (K) 40 (M)	36 34	4 6
	F_3	80 (K) 80 (M)	75 78	5 2
	F_4	160 (K) 160 (M)	141 158	19 2
420	F_1	20 (K) 20 (M)	20 20	
	F_2	40 (K) 40 (M)	38 40	2
	F_3	80 (K) 80 (M)	71 80	9
	F_4	160 (K) 160 (M)	139 158	21 2

Tabelle: 12

3.1.4. Der Zellkernbestand der Stämme im Vergleich zum Wildtyp

Wenn die Stämme -wie vorausgesetzt- aufgrund einer unterschiedlichen Kernzusammensetzung in ihren Eigenschaften differieren, dann sollten sich bei einer Isolierung der Kerne auch verschiedene Kernfraktionen nachweisen und charakterisieren lassen. Diese Aufgabe gehörte mit zu den schwierigsten der Arbeit, da sowohl die Isolierung als auch die Auftrennung der Kerne im Dichtegradienten zahlreiche Artefaktmöglichkei-

ten enthalten, die es galt, soweit wie möglich auszuschalten. Um eine übermäßige Schleimbildung zu verhindern, die den Präparationsgang erheblich stören würde, ist das Mycel auf Cellophanfolie auf festem Nährboden kultiviert worden. Grundsätzlich ist für die Kernisolierung 5 Tage altes Oberflächenmycel verwendet worden. Kurz vor der Isolierung wurde das Material weitgehend synchronisiert: nach zweistündiger Behandlung mit höheren Temperaturen (35°C) und anschließendem Aufenthalt bei 4°C für weitere zwei Stunden bei Dunkelheit befanden sich fast alle Kerne in der Interphase. Bei Verwendung von nicht synchronisiertem Mycel würden postmitotische kleinere Kerne das Auftrennungsergebnis verfälschen. Bei den Wildtypen ließen sich nach der Auftrennung im Sorbit-Dichtegradienten immer wieder mindestens drei verschiedene Kernfraktionen nachweisen, die in den einzelnen Auftrennungen nur schwach gegeneinander verschoben waren. Teilweise ist die Hauptfraktion nochmals in zwei kleinere Kernfraktionen aufspaltbar gewesen, jedoch kann hier durchaus auch ein Präparationsfehler vorgelegen haben. Bei den Stämmen 261, 271 und 311 ließen sich reproduzierbare Kernfraktionierungen erzielen. Das Ergebnis (Abb.19) zeigt, daß sich die Anzahl der Kernfraktionen reduziert, beim Stamm 271 sogar auf eine einzige Hauptfraktion. Aus der Tab. 13 geht hervor, daß es sich bei diesem Stamm auch um einen echten Homokaryonten handelt. Der Stamm 311 mit ähnlichem Heterokaryosegrad zeigt ebenfalls eine Hauptfraktion und nur eine sehr schwache zweite Fraktion, bei der es fraglich ist, ob man sie als Kernfraktion ansprechen darf.

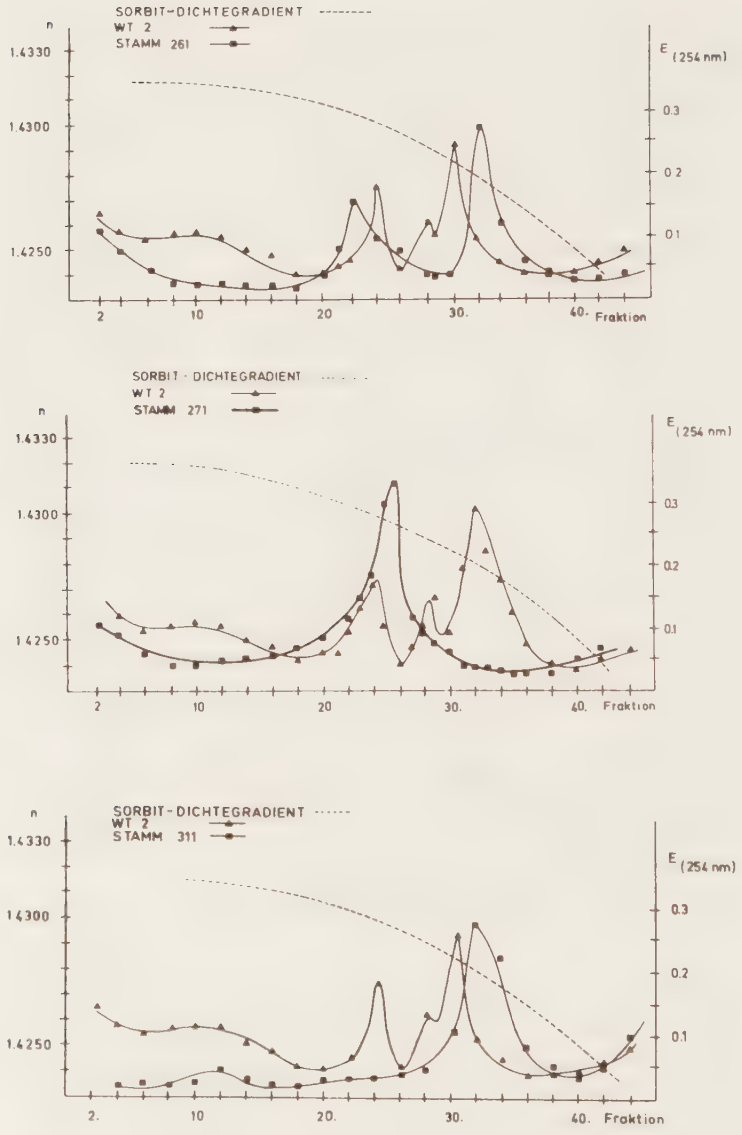


Abbildung: 19 Auftrennung der Kernfraktion im Dichtegradienten

Stamm	Kulturen insgesamt	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination 1. GENERATION					Kulturen insgesamt	prozentualer Anteil der Kulturen mit gleicher Merkmalskombination 5. GENERATION			
Wt 1	54	46,2	18,5	18,5	11,2	1,8	30	50	21,9	15,6	12,5
260	43	72	16,6	7	4,6		30	93,5	6,7		
261	43	93	4,6	2,5			31	93,5	6,7		
270	37	95	2,7	2,7			33	86	8,6	5,7	
271	38	97	3				32	100			
273	36	78	13,8	5,5	2,3		30	100			
283	21	48	48	4,8			30	95,5	3,4	3,4	
291	23	91,5	8,6				30	90	6,7	3,4	
Wt 2	72	39	30,5	23,6	4,2	2,8	30	52,9	16,7	12,9	17,4
301	32	87,5	9,3	3,1			32	94	6		
311	34	97	2,9				30	100			
354	33	94	6				30	83	10	6,7	
396	44	100					30	100			
WT 3	64	54,2	26,6	24,5	11	4,7	30	37	32,4	23,4	6,7
401	25	100					30	100			
420	38	97,5	2,5				30	93,5	3,3	3,3	
435	36	86	14				30	83,3	10	6,7	
436	36	100					30	90	10		

Tabelle: 13

Heterokaryosegrad der Wildtypen und der daraus isolierten Stämme in der 1. und 5. Generation

3.1.5. Elektrophoretische Charakterisierung der Stämme

Die Differenzierung eines Organismus wird immer von einer Aktivitätsänderung der Enzyme begleitet sein, wie es einige Autoren an N e u r o s p o r a nachgewiesen haben (MAHADEVAN und MAHADKAR, 1970; ZALOKAR, 1959 a und b). Der Alterungsprozess bringt eine umwälzende Veränderung des Enzymmusters mitsich, insbesondere die Reifung der Zellen bis zur Konidienbildung. Bei einem so entscheidenden Prozess, wie es die Umwandlung der Zellgestalt aus einer reichverzweigten Substrathyphe in eine Lufthyphe darstellt, sind die Faktoren, die einen solchen Vorgang induzieren oder steuern u.a. bei den Enzymen zu suchen. Das Aktivitätsmuster der Enzyme während der Morphognese ist aber von zahlreichen Faktoren abhängig, unter denen die Umweltfaktoren eine nicht geringe Rolle spielen. Auf der anderen Seite sind alle diese Vorgänge ein Ergebnis von Transskription und Translation. Diese beiden elementaren Prozesse sind während der Realisierung der Morphogenese wohl die bedeutensten. Die Regulation der Genwirkung auf der Ebene der Transskription wird verstärkt durch die Regulationswirkung der Translation. Als Ergebnis findet sich in der Zelle ein typisches Muster an Cytosol- und Strukturproteinen, das stadienspezifische Unterschiede aufweist, da jede Zelle optimal ökonomisch arbeitet und die entsprechenden Proteine erst dann synthestisiert, wenn sie sie braucht. Es gibt daher wohl kaum ein besseres, exakteres und spezifischeres Bezugssystem zur Beurteilung von morphogenetischen Vorgängen oder Stadien als die Cytosolproteine. Die Arbeiten von BIENENGRÄBER et al. (1968), GAIROLA und POWELL (1971), GLYNN und REID (1969) sowie MEYER und RENARD (1969) haben diesem Gedanken recht gegeben. Die Autoren haben die löslichen Proteine aus einer Anzahl von Arten gleicher Gattung oder aus einer Anzahl Stämmen gleicher Art elektrophoretisch aufgetrennt und die An- oder Abwesenheit sowie die Intensität von Proteinbanden einer Analyse und

einem Vergleich von bestimmten Mutanten zugrundegelegt. Die hierfür beste Methode ist augenblicklich die diskontinuierliche Elektrophorese an Polyacrylamidgelen (ORNSTEIN, 1964) (MAURER, 1968), auch wenn sie vielfach stark angefeindet wird. Die Fehlerquellen dieser Methode sind tatsächlich nicht zu unterschätzen. Bei der vorliegenden Arbeit bereitete es anfänglich große Schwierigkeiten, überhaupt eine elktrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine von B. c i n e r e a zu erzielen.

Bei der Proteinisolierung aus einem Gesamtmycel mußte berücksichtigst werden, daß es aus unterschiedlichen Zelltypen besteht. Die wachsenden Spitzenzellen mit reichem Protein- und Kernmaterial stehen den älteren, vakuolisierten Zellen gegenüber. Es wurde festgestellt, daß sich die Plasmaproteine beider Zelltypen nach dem Homogenisieren in einer für die elektrophoretische Auftrennung äußerst ungünstigen Weise gegenseitig beeinflussen. Die pH-Unterschiede zwischen Zellhomogenat aus wachsenden Zellen (pH 6 - pH 6,3) und Homogenat aus alten Zellen (pH 7,8 - pH 8) sind beträchtlich, sodaß an den Proteinen Denaturierungserscheinungen auftraten. Weiterhin trat eine Verschleimung des Proteinmaterials ein, die eine Auftrennung über Sephadex-Säulen fast unmöglich machte. Diese Verschleimung ist auf pektinreiches Material aus den älteren Zellen zurückzuführen. All diesen Fehlerquellen konnte durch geeignete Kulturbedingugen, durch schonendes Homogenisieren und Aufbereiten der Proteine im entsprechenden Puffersystem begegnet werden. So empfahl es sich, nur kleine Sporentiter pro Kulturkolben à 50 ml Nährlösung zu impfen und das Material schon nach 4 Tagen in Oberflächen- und Submersmycel zu trennen und sofort zu verwenden oder bei älterem Mycel eine Verklumpung des Mycelgrundes dadurch zu vermeiden, daß es auf Cellophanfolie herangezogen wurde. (Weitere Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden", S.10 ff).

Auswertung der Elektrophoresen

Anhand der Scankurven und der daraus resultierenden grafischen Darstellungen lassen sich die Auftrennungsergebnisse leicht miteinander vergleichen. Die Diagramme zeigen einen Sockel, in dem die Position der Banden unabhängig von ihrer Intensität angegeben sind. Über diesem Sockel gibt die Höhe der Säulen die Konzentration des jeweiligen Proteins als "relative Extinktion" bei 520 nm an. Es handelt sich insofern um eine "relative Extinktion", als die Höhe dieses Wertes von der Auftragungsmenge des Proteingemisches auf das Gel, von der Intensität der Untergrundfärbung im Gel und von der Einstellung des Meßinstrumentes abhängig ist. So sind trotz gleicher Auftragungsmengen in allen Gelen die Extinktionswerte nur relativ zueinander innerhalb eines Gels vergleichbar. Als Standardgel zur Einstellung des Meßinstrumentes diente ein Gel, in dem 50 µg Rinder-Serum-Albumin unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt wurde, wie die Proteine des Untersuchungsmaterials.

Da Polyacrylamidgele bei manueller Herstellung nicht alle absolut identisch sind, mußte eine leichte Verschiebung der Banden bei der Auswertung der Gele berücksichtigt werden. Die Position der Bande K gab Hinweise dafür, ob die Gele auswertbar und miteinander vergleichbar waren. Diese Bande hat einen Rf-Wert von 0,4. Es wurde festgelegt, daß diese Bande zwischen den Rf-Werten von 0,38 und 0,44 liegen mußte, damit die Gele miteinander verglichen werden konnten. Bei konidienfreien Stämmen wurden die Rf-Werte der Banden b und g (0,09 und 0, 49) als Richtwerte gewählt.

Die Proteine der Wildtypen zeigten in allen Auftrennungen 14 charakteristische Banden, die in den Diagrammen mit den Buchstaben a bis p bezeichnet sind. Die für die Konidienbildung charakteristische Bande ist mit K gekennzeichnet. Lediglich das l-Protein blieb bei einigen Auftrennungen

aus. In der Tab. 14 sind die Rf-Werte der 14 Hauptbanden zusammengestellt.

Bezeichnung der Banden	Rf-Wert	Bezeichnung der Banden	Rf-Wert
a	0,07	i	0,62
b	0,09	k	0,65
c	0,14	l	0,72
d	0,16	m	0,77
e	0,27	n	0,81
f	0,44	o	0,89
g	0,49	p	0,90
h	0,56	K	0,40

Tabelle: 14

Rf-Werte der 14 Hauptbanden der Cytosolproteine des Wildtyps nach elektrophoretischer Auftrennung im 7,5 % - tigen Polyacrylamidgel

Die Bande h war entweder eine breite, intensiv färbbare Bande oder eine Gruppe kleinerer Banden (z.B. Abb. 21 WT 2, Stamm 283, Stamm 420 und Stamm 273). Die in den Diagrammen als straffierte Säulen dargestellten Banden (z.B. in Abb. 23) sind breite und besonders auffällige Banden, die in der Scankurve nicht als Peak sondern als Plateau aufgezeichnet wurden Die unbezeichneten Banden waren z.T. beim Wildtyp nicht reproduzierbar. Bei den Stämmen hingegen ließen sich viele dieser Banden immer wieder nachweisen oder waren sogar besonders auffällig ausgeprägt;(sie sind dann im Diagramm mit einem Zahlenindex versehen).

Allen Konidienbildnern war eine ausgeprägte Bande K gemeinsam. Ihr kann ein Molekulargewicht von etwa 65 000 zugeordnet werden. Das Molekulargewicht ist durch Vergleichsproteine mit bekanntem Molekulargewicht ermittelt worden. Als Ausnahme ist der konidienfreie Stamm 435 zu nennen, der ebenfalls eine

Bande K zeigte. Die Stämme 260 und 273 zeigten einander sehr ähnliche Pherogramme. Beide Stämme sind keine Konidienbildner, sie wiesen aber in der Region der K-Bande mehrere scharfe Banden auf (Abb.20 und 21 oben), die bei induzierter Konidienbildung nach Puromycinbehandlung zu einer einzigen Bande K wurden (Abb. 61, Seite 133). Beim Stamm 291 ist K am weitesten in den niedermolekularen Bereich verschoben, sie hat hier einen RF-Wert von 0,42 (Abb. 20), ebenso wie alle untersuchten Konidienproteine, die auch K-Banden mit dem gleichen Rf-Wert zeigten (Abb. 23). Die K-Bande fehlte den konidienfreien Stämmen 261, 270 und 301 (Abb. 20). Bei fast allen Stämmen ließen sich die Banden a, b, e, f, h und i exakt zuordnen.

Wesentlich deutlicher als aus der Übersicht (Abb. 20) sind die Unterschiede in den elektrophoretischen Auftrennungen der Cytosolproteine aus den Abbildungen zu erkennen, in denen neben der Position der Banden auch deren Intensität angegeben ist. Dabei fällt auf, daß bei einigen Stämmen bestimmte Banden sehr intensiv ausgeprägt sind, die beim Wildtyp entweder gar nicht oder nur sehr schwach nachzuweisen waren: z.B. beim Stamm 420 die Bande l_2 (Abb. 21) und beim Stamm 271 die Bande o (Abb. 22) sowie beim Stamm 301 die Bande e_1.

Die Abb. 22 stellt die Proteinmuster der Konidien des Wildtyps im Vergleich zu den daraus isolierten Stämmen dar. Es bestehen zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den heterokaryotischen Konidien des Wildtyps und den homokaryotischen der Stämme. Die stark ausgeprägte K -Bande mit dem Rf-Wert von 0,42 war bei allen Präparationen von Konidienproteinen typisch. Kurz nach der Keimung reduzierte sich die Menge des K - Proteins erheblich, um im Laufe der Entwicklung wieder anzusteigen (Abb.26). Auch der Vergleich der Proteinbanden aus den verschiedenen Wachstumszonen bestätigte dieses Ergebnis: K ist in der Differenzierungszone am stärksten angereichert. Oberflächen- und Submersmycel unter-

scheiden sich nur geringfügig, wobei die starke h-Bande beim Oberflächenmycel besonders auffällt (Abb. 24).

Die elektrophoretische Auftrennung der Plasmaproteine wurde als besonders hilfreiche Methode bei der Überprüfung der Homogenität der Stämme oder der Konidien und zur Klärung der Frage nach der Wirkung von Puromycin eingesetzt. Die Ergebnisse ließen sich bei allen Homokaryonten reproduzieren. Die Unterschiede in den elektrophoretischen Bandenmustern der Cytosolproteine aller Stämme waren groß genug, um sie gegenüber dem Wildtyp abzugrenzen.

Abbildung: Übersicht über die elektrophoretischen Bandenmuster der Cytosolproteine der Stämme.

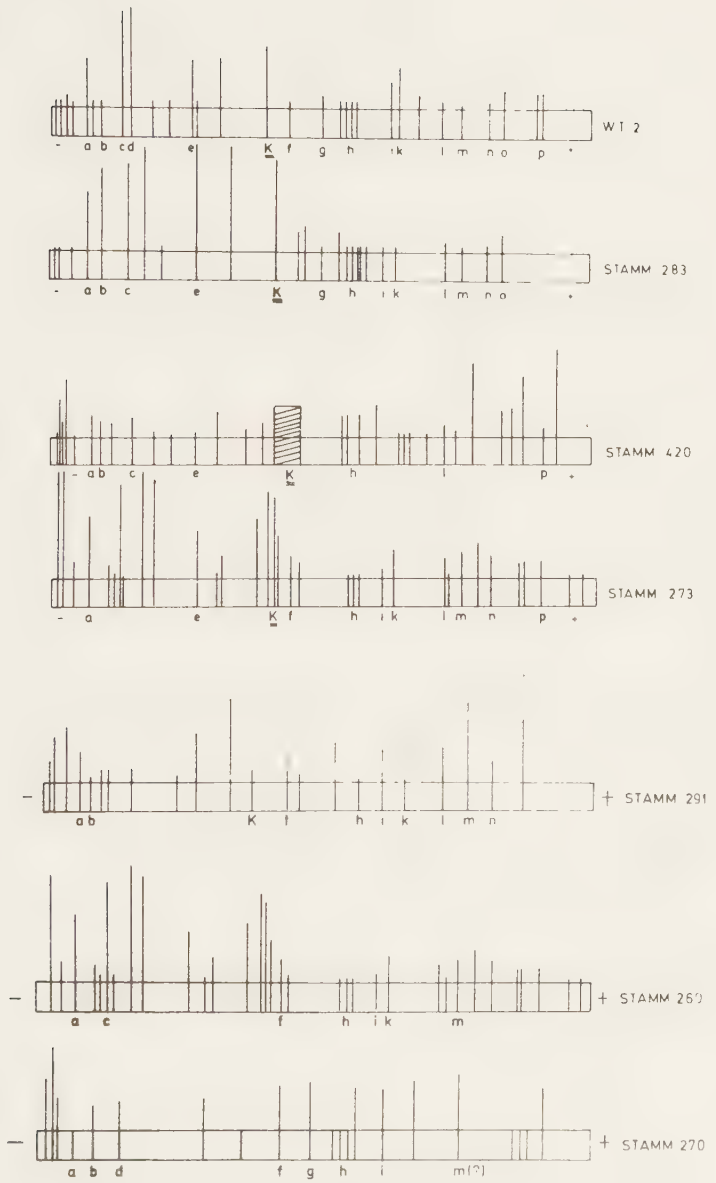


Abbildung: 21 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine einiger Stämme im Vergleich zum Wildtyp

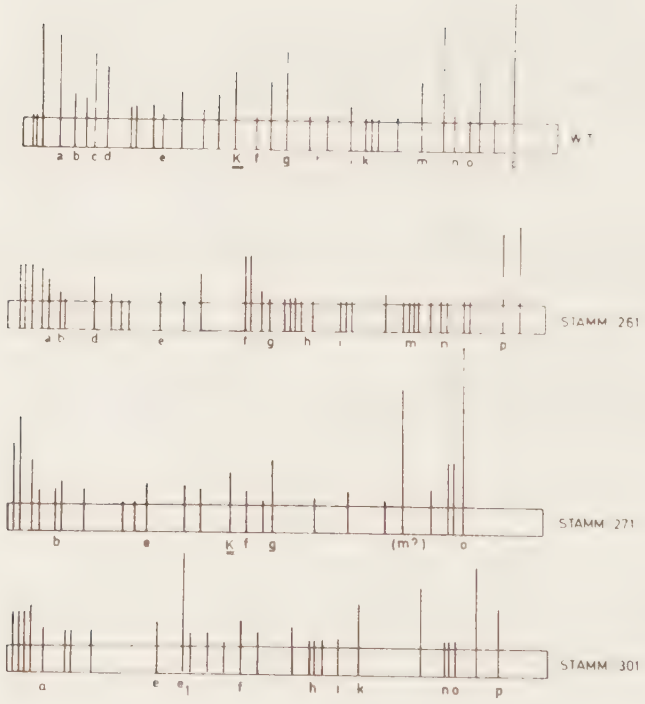


Abbildung: 22 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine einiger Stämme im Vergleich zum Wildtyp

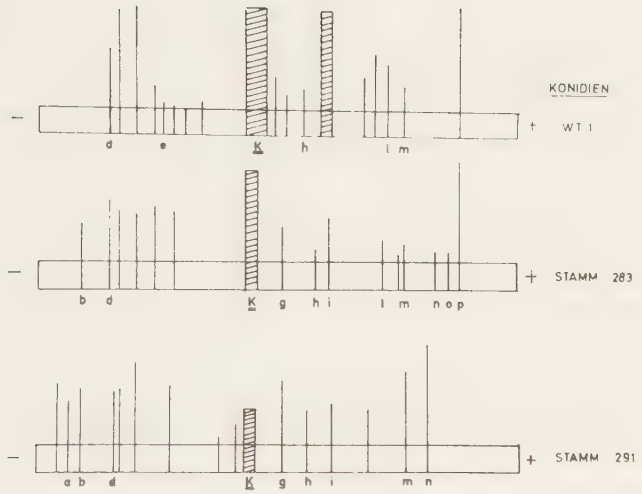


Abbildung: 23, Elektrophoretische Auftrennung der Konidienproteine des Wildtyps und zweier daraus isolierter Stämme

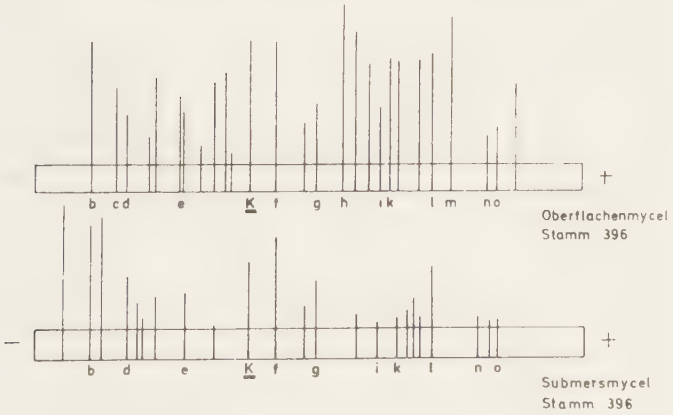


Abbildung: 24 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine von Oberflächen- und Submersmycel

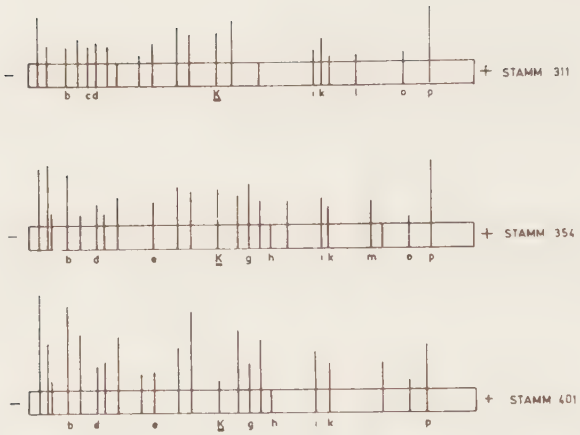


Abbildung: 25 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine dreier Stämme, die sich morphologisch voneinander unterscheiden, deren elektrophoretische Bandenmuster aber fast identisch sind

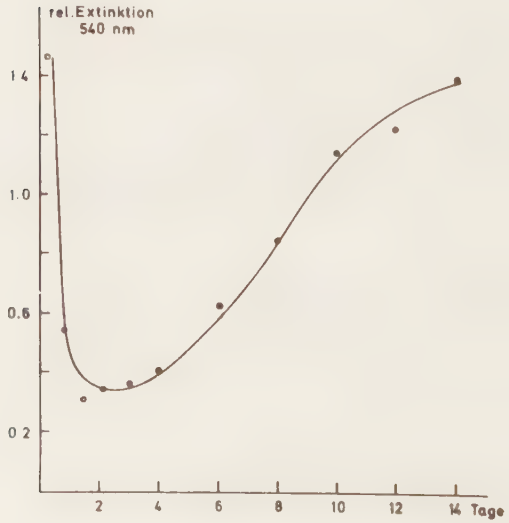
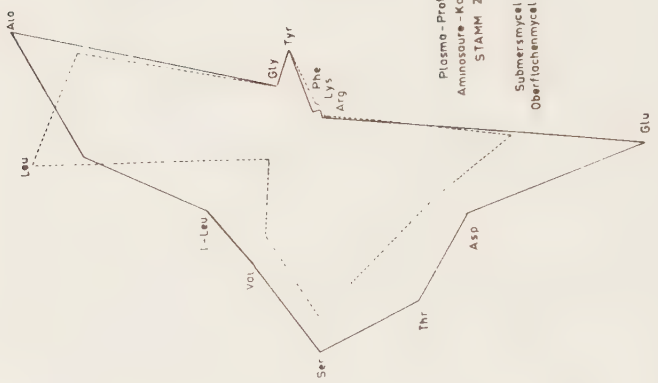


Abbildung: 26 Intensität der Bande K (als relative Extinktion) im Verlauf der Entwicklung

3.1.6. Aminosäurekomposition der Zellwand und des Plasmas

Bei den Stämmen 271, 291, 301, 311 und 354 ist die Aminosäurekomposition der Zellwand bestimmt worden. Die übrigen Stämme sind lediglich auf das Vorhandensein von Tyrosin geprüft worden (siehe Tab. 23). Das Hydrolysat von gereinigten Zellwänden enthielt insgesamt 120 - 210 µg Aminosäuren. Das Submersmycel wies mit 20 - 35 µg nur etwa 1/10 des Aminosäuregesamtgehalts des Oberflächenmycels auf. Der Gehalt der einzelnen Aminosäuren war jedoch dem des Oberflächenmycels fast identisch. Innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien gab es lediglich Unterschiede im Gehalt von Tyrosin, Valin, Isoleucin, Leucin und Hydroxyprolin. Die übrigen der insgesamt 13 chromatographisch nachweisbaren Aminosäuren variierten in ihrem Anteil an Gesamtaminosäuren nicht oder unbedeutend. Die Darstellung in Abb. 27 ist somit charakteristisch für Pigmentbildner und pigmentlose Stämme. Typisch für die Stämme 271, 291, 301 als Pigmentbildner war der hohe Gehalt an Tyrosin (siehe Tab. 23). Stark sklerotinisierte Zellen, wie Konidien oder Sklerotien wiesen einen hohen Anteil an Hydroxyprolin auf, eine Aminosäure, die sowohl im Plasma als auch in der Zellwand wachsender Hyphen nicht nachweisbar war und folglich auch nicht in die Sterndiagramme aufgenommen worden ist. Es war mit den angegebenen Methoden nicht möglich, reine plasmafreie Zellwand von Konidien oder Sklerotien zu erhalten, sodaß nicht geklärt werden konnte, ob das Hydroxyprolin ein Bestandteil der Zellwand ist oder ob es zu den Plasmaproteinen gehörte.
Die Zellwand unterschied sich erheblich in ihrer Aminosäurekomposition von der des Plasmas, wie es die Abb. 28 verdeutlicht. Die kleinen Differenzen zwischen der Zusammensetzung des Plasmas von Submers- und Oberflächenmycel liegen im Bereich der Fehlergrenze der Methode. Leucin bildet dabei jedoch eine Ausnahme: es war vorwiegend in jungen Mycelien und in Submerskulturen zu finden und in nicht so hoher Konzentration im Oberflächenmycel aus dem Bereich der Differenzierungszone.

Abbildung: 27



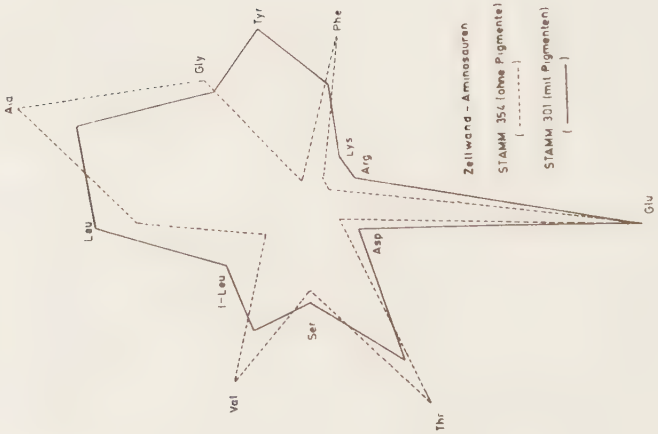


Abbildung: 28

3.1.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Untersuchungen einiger Stämme von B. c i n e r e a im Elektronenmikroskop erfolgten mit dem Ziel , den Aufbau der Zellwand von pigmentfreien und pigmentierten Stämmen miteinander zu vergleichen. Als Vorbereitung für diesen Vergleich ist B. c i n e r e a in verschiedenen Entwicklungsstadien präpariert worden, wobei sowohl Gefrierätzpräparate als auch Eponeinbettungen angefertigt wurden. Die Abb. 30- 31 zeigen die Feinstruktur der Hyphen aus der Differenzierungszone eines Pigmentbildners. Diese Zellen weisen ein dichtes Plasma mit geringer Vakuolisierung auf, Mitochondrien variabler Gestalt sowie die besonders großen Kerne mit ihren Kernporen. Das Plasma ist reich an endoplasmatischem Retikulum und im Bereich der Zellwand sind multivesikuläre Körper verschiedener Art besonders häufig. Das Plasmalemma weist im Schnittpräparat eine stark gefaltete Struktur auf. Hierdurch ist zwar die Doppelmembran deutlich zu erkennen, jedoch zeigt die Gefrierätzung, daß diese Fältelung durch die Präparation hervorgerufen wurde (Abb. 34). Die vielfach als Fixierungsartefakte bezeichneten Invaginationen des Plasmalemmas wurden auch bei unfixiertem Material in Gefrierätzpräparaten gefunden. Solche Präparate eigneten sich leider nicht für die Untersuchung der Feinstruktur des Cytoplasmas, zumal die Zellen starke Schäden bei dieser Präparation erleiden. Die Unterschiede zwischen Submers- und Oberflächenmycel sind die gleichen, wie sie zwischen jungen und älteren Hyphen bestehen: die Zellwand ist im Oberflächenmycel wesentlich stärker ausgebildet, das Cytoplasma ist vakuolisiert und enthält weniger Reservestoffe als das Submersmycel. Ob sich die Mitochondrien signifikant in ihrer Größe beim Vergleich von Submers- und Oberflächenmycel unterscheiden, konnte nicht festgestellt werden.

Besonders auffällig war beim Vergleich von pigmentierten und pigmentfreien Stämmen der unterschiedliche Aufbau der Zellwand. Die Zellwand besteht aus einer kontrastreichen äußeren Wand, die teilweise mit multivesikulären Körpern besetzt ist. Diese Wand hat in jungen Mycelien, insbesondere aber im Sub-

mersmycel eine lockere Struktur. Mit zunehmendem Alter verdichtet sich diese Struktur und gewinnt damit an Kontrast. Ihr ist eine zweite Schicht untergelagert, die wenig kontrastreich ist und keinerlei regelmäßige Feinstruktur aufweist. Diese Schicht ist sehr dünn und nicht in allen Präparationen zu finden gewesen. Ihr folgt eine dritte Schicht mit längsgerichteter Textur (Abb. 35). Zum Inneren der Hyphe hin nimmt der Kontrast der Textur ab. Diese Schicht zieht sich in die Querwände , wird dort jedoch kontrastärmer (Abb. 35). Bei jüngerem Mycel fehlt diese Schicht noch (Abb. 26 und 30) und statt dessen ist ein fast kontrastloser Bereich zu beobachten.

Mit zunehmendem Alter wird die dem Plasmalemma aufgelagerte innere Wand kontrastreicher und enthält teilweise multivesikuläre Körper (Abb. 36). Allen Pigmentbildnern gemeinsam war die besonders stark ausgeprägte äußere Wand. Nach der Sklerotinisierung des Mycels zeigt sie eine längsgerichtete Struktur (Abb.37). Sklerotien bestehen im Wesentlichen aus diesem Material (Abb. 38 und 39). Obwohl auch bei pigmentfreien Stämmen nach 4 - 6 Tagen multivesikuläre Körper gefunden wurden, zeichnen sich alle Pigmentbildner durch vermehrte Bildung dieser Strukturen aus (Abb.41). Es kann zwischen verschiedenen Typen von multivesikulären Körpern differenziert werden:

a) größere Körper mit scharf begrenzten, ringförmig um ein Zentrum angeordneten Schichten (Lomasomen)

b) unterschiedlich große Körper mit stark kontrastierter Wand, nicht kontrastiertem Innenraum, in dem sich kreisrunde Einschlüsse befinden. Auch diese Einschlüsse sind deutlich begrenzt und im Inneren schwach kontrastiert. Ihre Größe ist variabel, es sind bis zu 10 solcher Einschlüsse pro Körperchen gezählt worden. FLETSCHER (1973) beschreibt solche Strukturen als "paramural-bodies". Sie finden sich zum Teil auch innerhalb der Zellwand in einer Plasmalemmatasche. Diese Körperchen scheinen an der sekundären Zellwand-

bildung beteiligt zu sein. MARCHANT und ROBARDS (1968) haben Paramuralkörpern diese Funktion zugeschrieben.

c) relativ große Körper, deren Innenraum nicht kontrastiert ist und maximal ein Vesikel enthält oder leer erscheint. Solche Strukturen sind im Zellinneren von Pigmentbildnern zu finden, sie werden aber auch durch die Zellwand nach außen in das Medium abgeschieden. In Anlehnung an die Ausführungen von MITCHELL und SABAR (1966), PITT (1969) sowie RICHMOND und PRING (1971) muß vermutet werden, daß diese Organellen enzymatische Funktionen erfüllen, indem sie lytische Enzyme in das Substrat transportieren oder Pigmente an das Medium abgeben. Sie scheinen Teilweise die Funktion des Golgi-Apparates zu übernehmen; HEATH et al. (1971) haben in solchen Vesikeln Golgi-Aktivität nachgewiesen.

d) die kleinsten der multivesikulären Körper tragen im nicht kontrastierten Innenraum ein kontrastiertes Vesikel. Es handelt sich hierbei um "Hof-Körperchen" (FLETSCHER, 1973), die ähnliche Funktionen erfüllen wie die Paramuralkörper.

Über die Induktion der Pigmentbildung durch Puromycin wird später berichtet; an dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, daß nach Puromycinbehandlung extrem viele multivesikuläre Körper auftraten (Abb. 42).

Die elektronenoptischen Untersuchungen haben Hinweise für Unterschiede im Aufbau der Zellwand der einzelnen Stämme gegeben und über die Art der Pigmentbildung und Enzymabscheidung in das Medium informiert.

Abbildung: 26

Hyphenquerschnitt (Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)

Oberflächenmycel aus der Differenzierungszone eines pigmentfreien Stammes

1 : 20 000

Zellwand:	Zw	Kerne:	K
Plasmalemma:	Pl	Kernhülle:	KH
Plasmalemma-invaginationen:	PI	Chromatin:	Ch
Lomasomen:	Lo	Mitochondrien:	M
		Vesikel:	mV

Abbildung: 27

Schnitt durch eine ältere Hyphe (Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)

Kulturalter: 10 Tage, pigmentfreier Konidienbildner

1 : 30 000

Zellwand:	ZW	Mitochondrien:	M
Vakuolen	V	Plasmalemma:	Pl
endopl.Retikulum:	ER	Eingliederung von multivesikul. Körpern in die Zellwand:	▲
multivesikul. Körper:	mV		

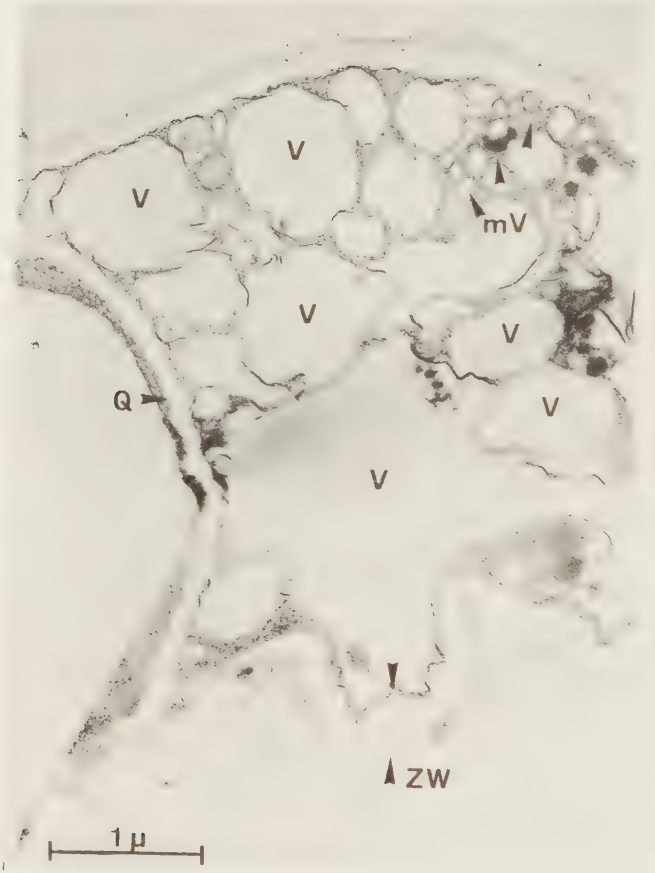


Abbildung: 28

Schnitt durch eine ältere Hyphe

(Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)

Kulturalter: 10 Tage, pigmentfreier Konidienbildner

1 : 30 000

Zellwand:	ZW	Querwand:	Q
Vakuolen:	V	multivesik. Körper:	mV

Abbildung: 29

Hyphenquerschnitt (Gefrierätzpräparat)
1:30 000

Plasmalemma: Pl
Kerne: K
Kernporen: Kp
Fettkörper oder Polyphosphate: F
Zellwand, vom Plasmalemma abgelöst: ZW

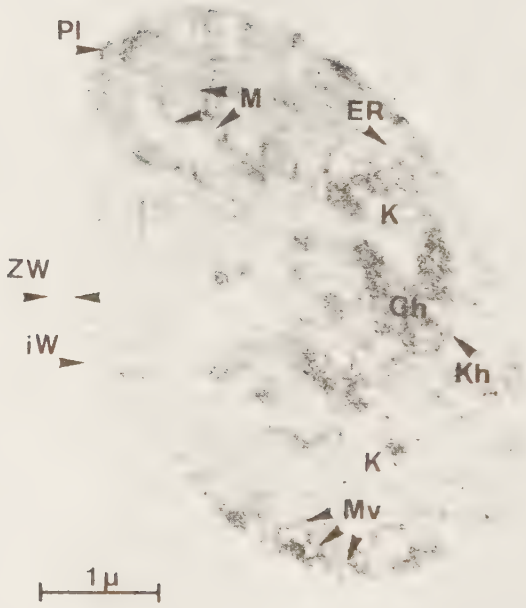


Abbildung: 30

Hyphenquerschnitt (Glutaraldehyd/ OsO_4/Uranylacetat)

Oberflächenmycel, aus der Differenzierungszone
6 Tage alt, Beginn der Pigmentbildung

1: 24 000

Zellwand:	ZW	Mitochondrien:	M
innere Zellwand:	iW	endoplsmat. Reticulum:	ER
Plasmalemma:	Pl	multivesikuläre	
Kern:	K	Körper:	Mv
Kernhülle:	Kh		
Chromatin:	Ch		

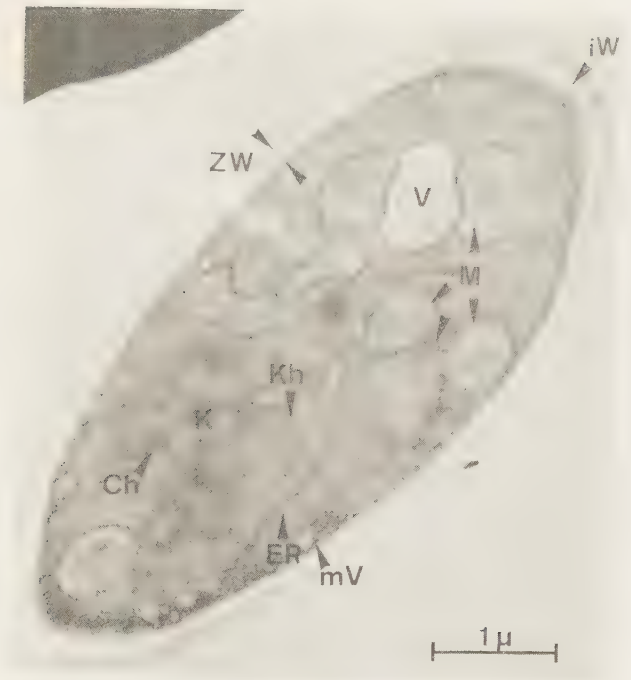


Abbildung: 31

Hyphenquerschnitt (Glutaraldehyd/ OsO_4 /Uranylacetat)
Oberflächenmycel aus der Differenzierungszone
6 Tage alt, Beginn der Pigmentbildung

1: 24 000

Zellwand:	ZW	Mitochondrien:	M
innere Wand:	iW	endoplasmat. Retikulum:	ER
Plasmalemma	Pl	multivesikuläre Körper:	mV
Kern:	K	Vakuole:	V
Kernhülle:	Kh		
Chromatin:	Ch		

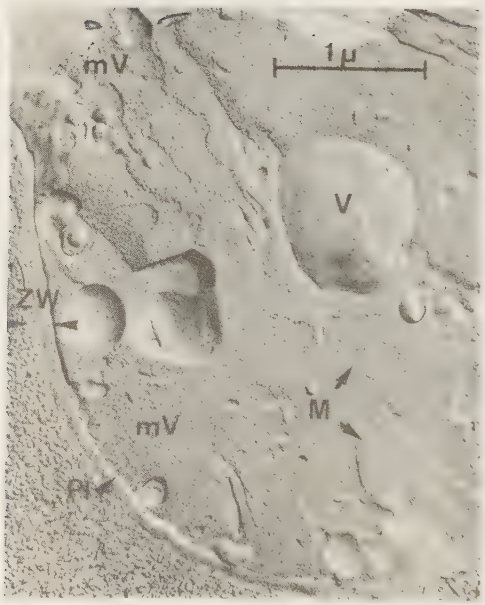


Abbildung: 32

Hyphe aus der Differenzierungszone eines Pigmentbildners (Gefrierätzpräparat)

1 : 30 000

multivesikuläre Körper:	mV
Mitochondrien:	M
Vakuole:	V
Plasmalemma:	Pl
Zellwand:	ZW

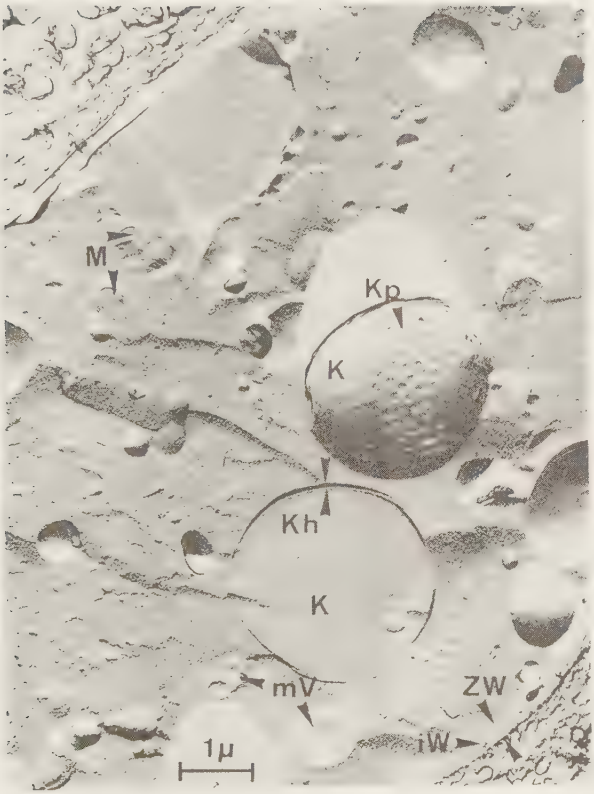


Abbildung: 33

Hyphenquerschnitt (Gefrierätzpräparat)
1: 14 000

Zellwand:	ZW	Kernhülle:	Kh
Innere Wand:	iW	Kernporen:	Kp
Kern:	K	multivesikuläre Körper:	mV

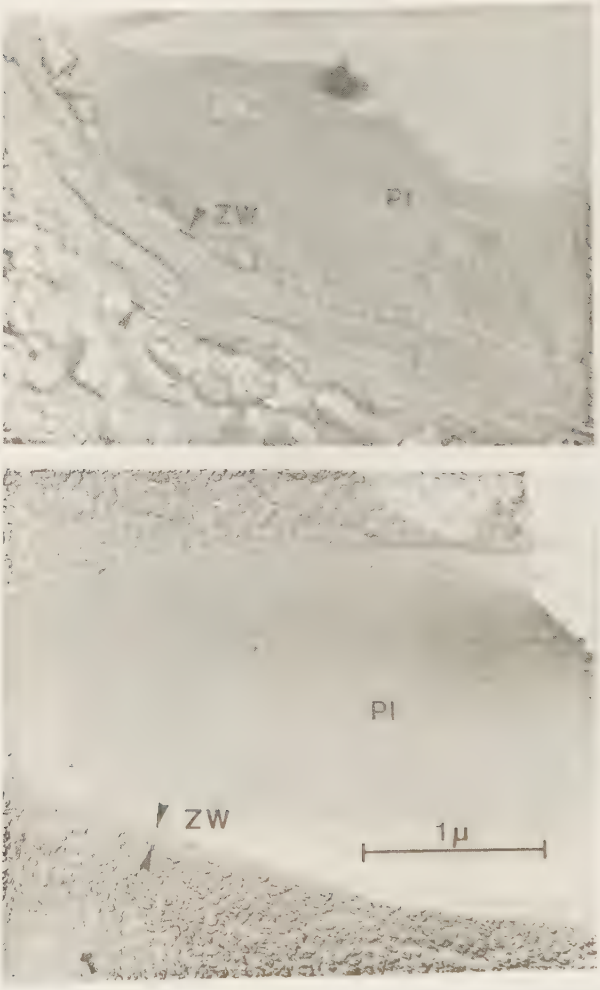


Abbildung: 34

Plasmalemma und Zellwand von unfixierten Hyphen (Gefrierätzpräparat)

1 : 36 000

oben: Oberflächenmycel
unten: Submersmycel

Zellwand: ZW Plasmalemma: Pl

Abbildung: 35

Schnitt durch die Hyphe eines Pigmentbildners (Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)

1 : 28 000

äußere Wand:	W	Vakuole:	V
Zellwandschichtung:	Sch	Mitochondrien:	M
innere Wand:	iW	endoplasmat.	
Querwand:	Q	Retikulum	ER
Plasmalemma:	Pl	multivesikuläre	
		Körper	M_{1-4}

Abbildung: 36

Vesikel in der Zellwand (Gefrierätzpräparat)
1 : 14 000

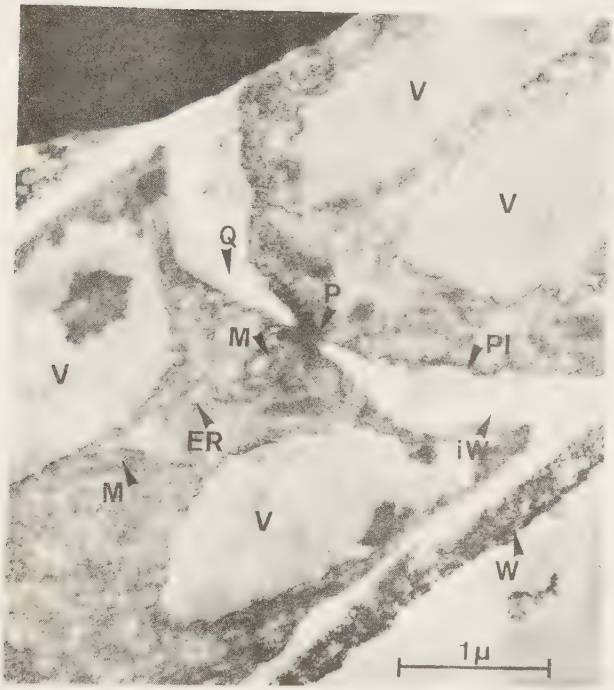


Abbildung: 37

Längsschnitt durch eine Hyphe
(Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)

1 : 30 000

Beginnende Sklerotinisierung der Zellwand

äußere Wand:	W	Vakuolen:	V
innere Wand:	iW	Mitochondrien:	M
Querwand:	Q	endopl.Retik.:	ER
Porus:	P		
Plasmalemma:	Pl		

Abbildung: 38

Sklerotien (Gefrieätzpräparat von unfixiertem Material)

1 : 25 000

Zellinneres: ZI
Reservekörper: R
Zellwand: ZW
Plasmalemma: Pl

Abbildung: 39

Sklerotien (Gefrierätzpräparat von unfixiertem Material)

1 : 25 000

Zellinneres:	ZI
Zellwand:	ZW
Plasmalemma:	Pl
Reservekörper:	R

Abbildung: 40

Vermehrtes Auftreten von multivesikulären Körpern bei Pigmentbildnern

(Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)
1: 30 000

Abbildung: 41

Vermehrtes Auftreten von multivesikulären Körpern verschiedener Art bei der Pigmentbildung

(Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)
1 : 30 000

Inkorporierung von multivesikulären Körpern in die Zellwand: ►

Abbildung: 42

Abscheidung von Stoffwechselprodukten und Pigmenten in das Medium nach induzierter Pigmentbildung durch Puromycinbehandlung

(Glutaraldehyd/ OsO_4/ Uranylacetat)
1: 36000

3.2. Konidienbildung

Grundsätzlich war B. c i n e r e a unter normalen Kulturbedingungen fähig zu sporulieren, wenn die Potenz zur Konidienbildung vorlag. Dies bedeutete, daß in der Konidie, aus der das Mycel entstand, bestimmte Kerne vorhanden gewesen sein müssen, damit die Sporulierungspotenz realisiert werden konnte. Für den Wildtyp ist das gegeben. Er sporulierte auch unter extremen Bedingungen, dann trat lediglich eine zeitliche Verzögerung ein und die Menge der gebildeten Sporen verringerte sich bei Kultivierung auf Mangelmedien. Dauerlicht hatte einen stimulierenden Einfluß auf die Konidienbildung. Niedrige Temperaturen verzögerten bei gleichzeitigem Dauerdunkel die Entwicklung des Organismus um eine beträchtliche Zeitspanne. Bei Einsporkulturen betrug diese Verzögerung bis zu 3 Wochen

Die Tab. 15 verdeutlicht einen weiteren Zusammenhang: je höher der Sporentiter einer Kultur war, desto schneller sporulierte sie auch, d.h. der gesamte Entwicklungsverlauf wird zeitlich durch Anzahl und Zustand der Sporen eines Impfflecks bestimmt.

Konidien / ml	Stamm	Zeitpunkt der Konidienbildung
1	WT	8. Tag
100	"	8. "
1000	"	7. "
10000	"	4. "
1	283	12. "
100	"	10. "
1000	"	8. "
10000	"	6. "

Tabelle: 15 Zeitpunkt der Sporulierung in Abhängigkeit vom Sporentiter des Impfflecks.

Die Spezialisierung einer Zelle zur Konidieophore erfolgte nicht in den wachsenden Spitzenzellen sondern in subapikalen Bereichen, die hier als "Differenzierungszone" bezeichnet werden. Für die Sporenbildung und den Zeitpunkt dieser Differenzierung ist die Dichte des Mycels entscheidend gewesen, wie Versuche gezeigt haben, bei denen unterschiedliche Sporentiter gleichmäßig über eine Platte geimpft wurden: die dicht beieinander liegenden Mycelien gelangten um ein bis zwei Tage eher zur Sporulation als die weit auseinanderliegenden in weniger dicht beimpften Kulturschalen. Das Alter der Mycelien ist bei dieser Betrachtung nicht zu vernachlässigen: wurden aus einem Mycelbereich, in dem sich erwartungsgemäß 48 Stunden später Konidien gebildet hätten, kleine Hyphenstücke herausgenommen und auf frischen Nährboden übertragen, so wuchsen diese Zellen normal aus und verhielten sich wie Keimmycelien. Der gleiche Versuch führte zu einem anderen Ergebnis, wenn die Hyphenstücke nur 24 Stunden älter waren als beim ersten Test: jetzt wurden auch auf frischem Nährboden von dem kleinen Hyphenstück zunächst Konidien gebildet unter gleichzeitiger Aufnahme des normalen Spitzenwachstums. Bei der Beurteilung des Zusammenhanges zwischen physiologischem Zustand der Zelle (ihrem Alter) und ihrer morphogenetischen Potenz zur Sporenbildung sollten diese Ergebnisse berücksichtigt werden, denn sie führen zu der Annahme, daß die Konidienbildung zwar vom Zustand des Ausgangsmaterials abhängig ist, insbesondere von den Kernen einer Spore (sonst wäre die Isolierung der konidienfreien Stämme durch Reduktion der Kernzahl einer Konidie nicht möglich), aber sie zeigen weiterhin, daß die Realisierung eines morphogenetischen Prozesses von weiteren Faktoren abhängig zu sein scheint. Um dieser Frage nachzugehen ist sowohl der physiologische Zustand der konidienbildenden Zellen (a) als auch ihr Substrat (b) und ihre Umgebung (c) untersucht worden und bei den einzelnen Stämmen miteinander verglichen worden.

3.2.1. Der physiologische Zustand konidienbildender Zellen

Wenn von dem physiologischen Zustand einer Zelle gesprochen wird, dann ist damit insbesondere das Enzymmuster gemeint, das die Zelle in einem bestimmten Entwicklungsstadium von älteren oder jüngeren Zellen unterscheidet. Dazu kommen mehr morphologische Charakteristika, die entweder wiederum physiologisch bedingt sind oder überhaupt erst einen definierten physiologischen Zustand ermöglichen, wie z.B. die Zellwand.

Die Proteine sind elektrophoretisch darstellbar gewesen. Die Pherogramme der Konidienbildner (Abb. 20, 21, 23, 24) zeichneten sich alle durch eine auffällige Bande ("K") aus, der ein Molekulargewicht von etwa 65 000 zuzuordnen ist. Die Konzentration dieses Proteins nahm während der Entwicklung zu (siehe Abb. 26, S. 74). Die Konidien und die Zellen aus der Differenzierungszone wiesen die höchsten Konzentrationen dieses Proteins auf.

Im Ribonukleinsäuregehalt unterschieden sich die Hyphen aus der Differenzierungszone nur geringfügig von denen aus der Wachstumszone (Tab. 16).

	RNS-Gehalt (µg/mg)
Apikalbereich	67 - 88
Subapikalbereich ohne Konidien	55 - 76
Differenzierungszone ohne Konidien	50 - 70
Konidien	80 - 90

Tabelle: 16
RNS-Gehalt einzelner Mycelregionen

Auffällig war beim Vergleich der Aminosäure-Komposition von Konidienbildnern und konidienfreien Stämmen, daß bei Konidienbildnern in den konidienbildenden Zellen und in den Sklerotien Hydroxyprolin im Chromatogramm nachweisbar war. Diese Aminosäure fehlte in der Wachstumszone. Hydroxyprolin wirkte nicht als auslösender Faktor für die Sporogenese.

Die Konidienbildung als eine Reaktion auf Nährstoffmangel zu erklären, scheidet aus, da Versuche mit konidienfreien Stämmen gezeigt hatten, daß Nährstoffmangel die Sporogenese nicht auslöst. Außerdem reagierten die Wildtypen auf ein Überangebot von Nährstoffen mit intensiver Konidienbildung. Dies zeigt aber deutlich, daß es unzureichend war, nur den physiologischen Zustand der Zellen zu untersuchen, da der Regulation dieses Differenzierungsschrittes eine Wechselwirkung von endogenen und exogenen Faktoren zugrunde zu liegen scheint.

3.2.2. Der Einfluß des Substrats

Im Zusammenhang mit einer Induktion der Konidienbildung haben viele Autoren den Einfluß des Substrats beschrieben und teilweise auch überschätzt (BROWN, 1923; RIPPEL, 1933; REAVILL, 1954; TOPPS und WAIN, 1957; KOVACS und SZEOKE, 1956; NIEDERPRUEN et al., 1964; LOCKHARD, 1969). Von einer Induktion dieses morphogenetischen Prozesses kann nur in zwei Fällen gesprochen werden:

1. wenn der Organismus nie oder selten oder erst dann Konidien bildet, wenn durch Änderungen des Substrats oder der Umwelteinflüsse (Licht, Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt) die Sporulation erfolgt.

2. wenn der Organismus nach entsprechenden Veränderungen der Kulturbedingungen v e r f r ü h t Sporen ausbildet.

Der erste Fall wird häufig beobachtet, wenn Stammkulturen von Pilzsammlungen über einen längeren Zeitraum hin auf dem gleichen Nährmedium kultiviert werden: die Kulturen "verarmen" und lassen in ihrer Sporulationsintensität nach. Um dies zu verhindern sind die eigenen Kulturen für die vorliegende Arbeit im Abstand von zwei Monaten immer wieder auf V 8 - Agar (MILLER, 1955) "regeneriert" worden. Wie schon erwähnt, blieb dies in Bezug auf die Konidienbildung bei den konidienfreien Stämmen stets ohne Erfolg. Das gleiche galt für den Einfluß von Malzinzusätzen, die allein beim Wildtyp eine erhöhte Sporenbildung bewirkten.

Im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit war das Problem vorherrschend, in welcher Weise das Substrat vom Mycel selbst vorbereitet wird, sodaß zu einem definierten Zeitpunkt die Konidien gebildet werden, d.h. es ging um Produkte, die der Pilz selbst ausscheidet, um einen morphogenetischen Prozess der Sporulierung zu induzieren. Es handelt sich dabei um eine echte I n d u k t i o n im obigen Sinne, zumal beim Fehlen dieser Produkte entweder eine sehr späte und spärliche oder überhaupt keine Konidienbildung erfolgt. In einer kontinuierlichen Kultur, in der dem Mycel ständig neues Medium zufloß und in dem selben Maße altes abgezogen

wurde (Abb. 43), konnte nachgewiesen werden, daß die Konidienbildner (Stamm 271, 283, 291 und 311) ohne das Vorhandensein stoffwechseleigener Produkte im Medium nicht sporulierten.

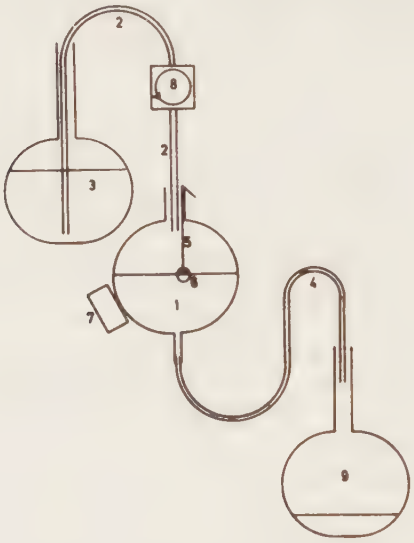


Abbildung: 43 Aufbau einer kontinuierlichen Kultur

1: Kulturgefäß mit etwa 500 ml Nährlösung
2: Zuleitung für frisches Nährmedium
3: Vorratsgefäß für frisches Nährmedium
4: Überlauf zum Ableiten alten Mediums
5: Glasstab mit Häkchen
6: Mullsäckchen mit auf Agar angekeimtem Impfmaterial. Es verhindert das Absinken des Mycels.
7: Magnetrührer
8: peristaltische Pumpe
9: Auffanggefäß für verbrauchten Nährboden

Die Versuche in der kontinuierlichen Kultur haben ergeben, daß dem Organismus der entsprechende physiologische Zustand seiner konidienbildenden Zellen keineswegs ausreicht, um die morphogenetische Potenz seiner Zellen zu realisieren, er ist weiterhin auf das Medium angewiesen, das diesem Zustand

a d ä q u a t ist. Das bedeutet, im festen Nährboden besteht zwischen Mycel und Substrat eine intensive Wechselwirkung in dem Sinne, daß stadienspezifische Substanzen in das Medium abgeschieden werden, die zu einem späteren Zeitpunkt ihrerseits auf die auslösenden Faktoren morphogenetischer Prozesse zu wirken haben.
Hieraus entwickelte sich ein vorläufiges, erstes Schema zur Realisierung der Morphogenese (Abb. 44).

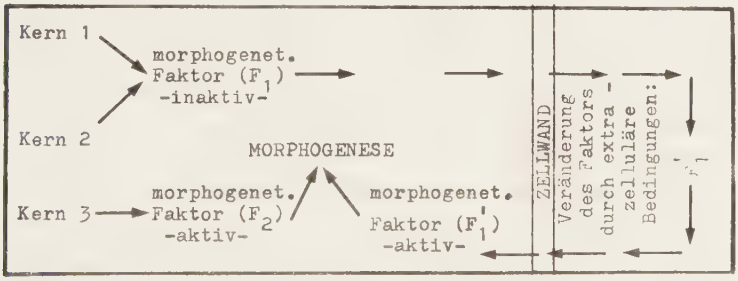


Abbildung: 44 Wechselwirkungen zwischen Mycel und Substrat, zwischen inter- und extrazellulären Faktoren als Voraussetzungen zur Realisierung eines morphogenetischen Prozesses.

Die einfachste Möglichkeit eines solchen Kreislaufs ist die, daß das Mycel den pH-Wert des Nährmediums durch Abscheidung von Stoffwechselprodukten so verändert, daß allein durch die pH-Änderung eine Sporulation begünstigt wird. Dies schied als Möglichkeit jedoch aus, da in der kontinuierlichen Kultur allein durch allmähliches acidisieren oder alkalisieren des Mediums mit Salzsäure, Essigsäure, Phosphorsäure, Weinsäure, Citronensäure bzw. Natronlauge oder Kalilauge (jeweils n/10) keine Konidienbildung herbeizuführen war. Somit müssen es die Stoffwechselprodukte selbst sein, die die beschriebene Wirkung haben.

Die Wirkung des Wildtypsubstrats
auf konidienfreie Stämme

Übertragungsversuche, bei denen altes, die stadienspezifischen Stoffwechselprodukte des Wildtyps enthaltendes Medium daraufhin getestet wurde, ob diese Produkte eine Konidienbildung auslösen könnten, versprechen Aufklärung über die Art und Weise der Induktion. Die ersten erfolgreichen Ansätze gelangen bei Kulturen der konidienfreien Stämme 261 und 270. Drei Tage altes Mycel wurde auf einen Nährboden übertragen, auf dem der Wildtyp vorher auf einer Cellophanfolie gewachsen war. Die Folie verhinderte das Eindringen des Pilzes in das Substrat und gestattete es, den Pilz ohne Mycelrückstände sauber vom Substrat wieder zu entfernen. Auf der vom Mycel befreiten Folie ließen sich sogenannte Fraßspuren nachweisen, die der Pilz durch das Ausscheiden von geringen Mengen an Cellulasen verursacht, ohne dabei jedoch die Folie völlig zu zerstören. Die angegriffene Folie war für Stoffwechelprodukte nachweislich durchlässig.

Abbildung: 45
"Fraßspuren" auf Cellophanfolie.
(Um die Spuren besser sichtbar zu machen, ist die Folie leicht angefärbt worden.)

Nach Entfernen der Folie wuchsen die überimpften Mycelstücke der konidienfreien Stämme auf definierten Regionen des alten Substrats (siehe "Material und Methoden", Seite 36). Wurden die Mycelstücke aus verschiedenen Wachstumszonen entnommen, so erbrachten d i e Übertragungsversuche den bei weitem deutlichsten Induktionseffekt, in denen Zellen aus der Differenzierungszone des konidienfreien Stammes auf Nährboden aus der gleichen Zone des Wildtyps gesetzt worden waren. Mycel aus der Wachstumszone reagierte auf Nährsubstrat aus

der Wachstumszone weniger deutlich mit einer schwachen Konidienbildung. Das gleiche galt für Mycel aus der Differenzierungszone, dem Nährboden aus der Wachstumszone angeboten wurde.

Der umgekehrte Weg, bei dem in einem Lochtest in vorbereitete Löcher von unbewachsenem Agar die entsprechenden Nährbodenstücke aus den auszutestenden Zonen einer bewachsenen aber mycelfreien Platte lückenlos eingefügt wurden, zeigte das gleiche Ergebnis. Der konidienfreie Stamm, der ungehindert über eine solche Platte wuchs, bildete an den Orten mit Wildtypsubstrat Konidien. Das positive Ergebnis blieb bei den Stämmen 273 und 301 aus.

Dieser Weg, Nährsubstrat auszutesten, blieb letztlich wegen der zwar deutlichen aber äußerst schwachen Induktion unbefriedigend, sodaß flüssiges Medium von konidienbildenden Kulturen eingesetzt wurde. Alle verwendeten Stämme reagierten auf das Wildtypsubstrat mit einer Induktion der Konidienbildung, lediglich die Stämme 273 und 301 blieben konidienfrei.

Die Wirkung der Substrate verschiedener Stämme auf konidienfreie Stämme

In der beschriebenen Weise sind in weiteren Übertragungsversuchen Substrate von homokaryotischen Konidienbildnern auf ihre Wirksamkeit hin geprüft worden. Die Tab. 17 verdeutlicht, daß nur wenige Induktionen zu beobachten waren, woraus geschlossen werden mußte, daß bei der Konidienbildung auch e n d o g e n e, c y t o p l a s m a t i s c h e Faktoren beteiligt sein müssen. Entweder geben einige Stämme stammspezifische exogene Faktoren in das Medium ab, die bei anderen Stämmen nicht wirken, oder die Stämme haben stammspezifische endogene Faktoren, die in Wechselwirkung mit ganz bestimmten exogenen Faktoren stehen. Die einfachste Möglichkeit wäre die, daß man einen einzigen, bei allen Stämmen

und dem Wildtyp gleichen exogenen Faktor annimmt, ja eventuell auch nur einen einzigen cytoplasmatischen Faktor voraussetzt. Um hierüber etwas aussagen zu können, war es notwendig, die Zusammensetzung der Substrate genauer zu untersuchen.

Substrat	Empfänger	Induktion	keine Induktion	nicht auszuwerten
WT 1	260	10	0	
	270	12	0	
	273	0	10	
	301	0	8	2
271	260	3	7	
	270	4	5	1
	273	5	4	1
	301	1	9	
283	260	0	9	1
	270	3	6	1
	273	2	8	
	301	8	2	
291	260	1	6	3
	270	0	10	
	273	3	6	1
	301	2	7	1
311	260	0	10	
	270	1	3	7
	273	0	7	3
	301	4	5	1

Tabelle: 17

Induktion der Konidienbildung durch Einwirkung von Substraten verschiedener Herkunft (Konidienbildner) auf Zellen konidienfreier Stämme.
Angabe der Induktion als Anzahl der Platten mit positivem Ergebnis.
Nicht auszuwerten waren kontaminierte Platten.

3.2.3. Zusammensetzung der Substrate

Aus 20 Kulturen des Wildtyps ist der mycelfreie Nährstoffagar nach Wachstumszonen ausgestanzt und eluiert worden. In den gereinigten Eluaten ließen sich Proteine, nukleotidhaltiges Material (Nachweis von RNS nach WEBB positiv), Oxidasen und Melanine nachweisen. Die Tab. 18 gibt Auskunft über die quantitative Verteilung dieser Produkte und verdeutlicht, daß Ribose und Proteine sich in der Differenzierungszone besonders stark anreichern, während im subapikalen Bereich und in altem Nährboden Oxidasen zu finden sind. Melanine sind in der Differenzierungszone und den nächst folgenden älteren Zonen anwesend, besonders stark jedoch unter den ältesten Zellen, wo auch Glukose infolge autolytischer Prozesse im Nährboden vorhanden ist. Die Abscheidung von Oxidasen in das Medium und die darauf folgende Melaninbildung steht in engem Zusammenhang mit der zellzerstörenden Tätigkeit des Pilzes unter natürlichen Bedingungen (siehe auch S. 120).

Die Proteine, die aus den Agarmedien isoliert wurden, waren in so geringen Konzentrationen vorhanden, daß sie nicht elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten. Daher wurden flüssige Medien verwendet, aus denen sich durch Unterdruckdialyse die Proteine anreichern ließen. Die elektrophoretische Auftrennung der Substratproteine (Abb. 47) zeigte, daß hauptsächlich Proteine mit höherem Molekulargewicht im Medium nachweisbar waren. Eine intensiv gefärbte, breite Bande fiel besonders auf. Sie hat einen Rf-Wert von 0,49 und ist damit nicht identisch mit der Bande K (siehe S. 67). In allen Wachstumsstadien wurde das gleiche elektrophoretische Bandenmuster der Substratproteine gefunden. Mit den geschilderten Methoden konnten bei den Stämmen keine Unterschiede im elektrophoretischen Bandenmuster der Substratproteine gefunden werden (Abb. 47).

Unter bestimmten Bedingungen, insbesondere, wenn der Pilz in kleinen Kulturgefäßen auf flüssigem Medium herange-

zogen wurde und dann längere Zeit bei 4°C lagerte, bildeten sich kleine, intensiv gelb gefärbte Tröpfchen auf der Myceloberfläche, die in hochkonzentrierter Form Proteine, Nukleotide und Ribose enthielten. Ihr Proteinmuster war mit demjenigen der Proteine aus dem Nährboden identisch. Diese Ausscheidungsprodukte hatten einen wachstumshemmenden Einfluß auf junges Mycel, bewirkten aber eine verfrühte Konidienbildung. Diese Tröpfchen sind wegen ihres hohen Gehalts an Proteinen und Nukleotiden gesammelt worden, damit daraus eine reine Proteinfraktion gewonnen werden konnte und diese im Übertragungsversuch in verschiedenen Konzentrationen an einem konidienfreien Stamm ausgetestet werden konnte. Die reine Proteinfraktion verursachte keine oder nur eine äußerst schwache Induktion der Konidienbildung. Die nukleotid- und ribosehaltige Fraktion hingegen zeigte eine starke Induktionswirkung bei allen Stämmen, die auch auf das Angebot des Wildtypsubstrats positiv reagierten (Abb. 46).

Eine nähere biochemische Analyse dieser Fraktion war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich und hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Das Resultat der geschilderten Versuche führte zu der Annahme, daß der Pilz a r t s p e z i f i s c h e Stoffwechselprodukte in das Medium abscheidet, unter denen hinsichtlich einer Auslösung der Konidienbildung insbesondere der nukleotid- und ribosehaltigen Fraktion eine besondere Bedeutung zukommt. Bei den exogenen Faktoren scheint es sich immer um denselben Faktor zu handeln, der auch von konidienfreien Stämmen gebildet wird. Diesen Stämmen wiederum scheinen ein oder mehrere endogene cytoplasmatische Faktoren zu fehlen, damit es zur Konidienbildung kommen kann.

	Wachstumszone	subapikaler Bereich	Differenzierungszone	älterer Mycelbereich
Proteine	-	-	36	147
Oxidasen	-	-	+	-
Ribose und Nukleotide	-	-	27	12
Melanine	-	-	+	+++
Glukose	-	-	-	230

Tabelle: 18

Zusammensetzung des Substrats der verschiedenen Wachstumszonen.

(Die quantitativen Angaben sind Mittelwerte
Angaben in µg/ml Eluat)

Der hohe Proteingehalt im Nährboden aus älterem Mycelbereich ist auf autolytische Prozesse zurückzuführen.

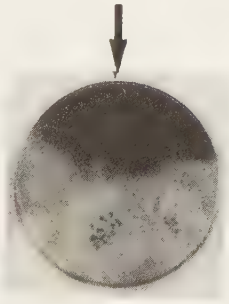


Abbildung: 46

Lochtest mit der ribosehaltigen Fraktion des Substrats

(↓ Ort der Zugabe der Fraktion. In dem Bereich, in den die Fraktion hineindiffundierte, zeigte sich die induzierte Konidienbildung bei dem sonst konidienfreien Stamm)

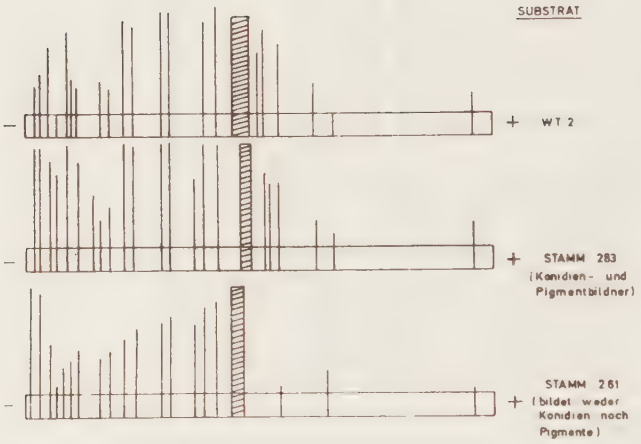


Abbildung: 47

Elektrophoretische Auftrennung der Substratproteine

3.2.4. Die endogenen Faktoren der Konidienbildung

In der Tab. 19 und 20 sind die Übertragungsversuche zusammengestellt, die in ähnlicher Weise wie die beim Test der exogenen Faktoren angelegt worden waren, d.h. zunächst wurde aus dem Wildtyp Zellhomogenat (partikelfrei und frei von Zellwandbruchstücken) einigen Zellen konidienfreier Stämme in der beschriebenen Weise angeboten und dann wurde die Wirkung verschiedener Zellhomogenate von Konidienbildnern auf die entsprechenden konidienfreien Stämme ausgetestet. Das Material, das dem Wildtyp entnommen wurde, führte bei den behandelten Zellen in allen Fällen zu einer Konidienbildung. Bei den Versuchen, in denen Zellhomogenat aus Konidienbildnern mit Zellen von konidienfreien Stämmen zusammengebracht wurde, blieb in drei Fällen eine Induktion der Konidienbildung aus: die Stämme 260, 301 und 270 reagierten auf keine der ihnen angebotenen Homogenate positiv. Eine Kreuzung der Stämme 260 und 301 führte zu einem Mischprodukt ohne Konidien. Der Einsatz der Zellhomogenate des Stammes 270 (ebenfalls ein konidienfreier Stamm) führte aber nun zur Auslösung der Konidienbildung. Aus diesem Versuch wurde die Annahme bestätigt, daß mehrere endogene Faktoren vorliegen müssen, damit eine Konidienbildung eingeleitet werden kann. Die endogenen Faktoren sind stammspezifisch, ihre Synthese ist kernabhängig und ihre Wirkung ist substratabhängig.

Fraktionierung des Zellhomogenats und Einsatz der einzelnen Fraktionen im Übertragungsversuch

In vergleichbaren Arbeiten ist auf die Schwierigkeiten einer Faktorenanalyse wiederholt hingewiesen worden (GRIGG, 1960; CANTINO und LOVETT, 1964; CANDRALL und BROCK, 1968; KRONBERG et al., 1968; CHUNG und TREVITHICK, 1970; MAHADEVAN, 1970). Die Autoren beschreiben eine ganze Reihe von Faktoren,

die im Zusammenhang mit der Induktion morphogenetischer Prozesse stehen. Nicht nur größeren Molekülen, wie Proteinen oder Nukleinsäuren kommt eine regulative Bedeutung zu, sondern auch Aminosäuren (NEIDHARDT, 1966). Die Wege, die in den meisten Arbeiten bei der Suche nach solchen Faktoren beschrieben werden, ähneln sich sehr. Vielfach gelangt man über Experimente mit spezifischen Hemmstoffen verschiedenster Art zur Lösung des Problems. Aber gerade diese Versuche haben den Nachteil, daß unkontrollierbare Nebeneffekte das Ergebnis verfälschen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist der direkte Weg gewählt worden, der sich bei Untersuchungen am tierischen Objekt bewährt hat (TIEDEMANN, 1969). Hierbei werden zelleigene Produkte im Testansatz verwendet, nachdem sie schonend isoliert und gereinigt worden sind. Aus einem Gemisch von solchen Produkten (aufgetrennt nach Aminosäuren, Nukleinsäuren und Proteinen) wird im systematischen Ausschlußverfahren der entscheidende Faktor ermittelt. Dieses Verfahren war schon bei der Versuchsserie mit dem Substrat erfolgreich gewesen. So ist bei der Suche nach den endogenen Faktoren in ähnlicher Weise vorgegangen worden. Diese Experimente sind am Wildtyp und den Stämmen 271, 291 und 311 durchgeführt worden, die als S p e n d e r s t ä m m e dienten. Als E m p f ä n g e r wurden die Stämme 260, 261, 301 und 435 eingesetzt.

Das zellwand- und partikelfreie Zellhomogenat ist nach verschiedenen Methoden fraktioniert und im Übertragungsversuch eingesetzt worden. Erfolgreich im Sinne einer Induktion der Konidienbildung war lediglich die Proteinfraktion. Die größten Schwierigkeiten bereitete es, die geeigneten Konzentrationen zu finden, zumal sich bei höheren Konzentrationen eine Wachstumshemmung der Empfängerzellen einstellte. Dies galt insbesondere für die Nukleinsäurefraktion. Die Konzentration an Proteinen, die beim Einsatz von nicht fraktio-

niertem Material eine Induktion hervorbrachten, stimmten nicht mit denjenigen überein, die schließlich bei der Anwendung der reinen Proteinfraktionen zu einer Induktion führten. Die Konzentrationen, die in den einzelnen Übertragungsversuchen eine Induktion der Konidienbildung auslösten, schwankten beträchtlich (Abb. 48).

Die Nukleinsäurefraktion, die von Nukleotiden und Ribose nicht gereinigt wurde, hauptsächlich aber aus Ribonukleinsäure bestand, führte zu keiner Induktion der Konidienbildung.

Aus den Aminosäuren, die nach chromatographischer Analyse der hydrolysierten Cytosolproteine im Organismus nachzuweisen waren, sind Gemische zusammengestellt worden und ihre Wirkung hinsichtlich einer Induktion der Konidienbildung im Diffusionstest geprüft worden. In sämtlichen Versuchsansätzen dieser Art konnte keine Induktion der Sporenbildung beobachtet werden. Änderungen der Konzentrationen und der Zusammenstellung der Aminosäuren, sowie Beimischungen der chromatographisch nicht nachgewiesenen Aminosäuren, blieben ebenfalls ohne Erfolg. Hinsichtlich des Aufwands dieser Versuche sind die Aminosäuregemische jedoch lediglich beim Stamm 261 angewendet worden, der auf eine Induktion durch den Wildtyp besonders leicht reagierte.

Eine genaue Analyse, die zur Auffindung der entscheidenden Faktoren aus der Proteinfraktion führen müßte, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr vorgenommen werden.

Übertragungsversuche mit kernlosem und kernhaltigem Zellhomogenat

Aus den Stämmen 291 und 311 wurden die Zellhomogenate in eine zellwandfreie kernhaltige und eine zellwandfreie kernlose Fraktion aufgeteilt und parallel im Übertragungsversuch

bei den Stämmen 260, 261, 270, 273 und 301 eingesetzt. Die Ergebnisse wichen nicht von denen ab, die in der Tab. 20 dargestellt sind. Beide Fraktionen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Empfängerzellen nicht (Tab.21 und 22).

Zellhomogenat (Spenderstamm)	Empfänger-stamm	Induktion	keine Induktion
WT 1	260	3	2
	261	5	
	270	5	
	273	1	4
	301	4	1
WT 2	260	2	3
	261	5	
	270	4	1
	273	5	
	301	1	4
WT 3	260	1	4
	270	1	2
	273	5	
	261	5	
	301	5	

Tabelle: 19

Induktion der Konidienbildung durch Zusatz von zellwandfreiem und partikelfreiem Zellhomogenat der Wildtypen zu konidienfreien Empfängerstämmen
(Dargestellt ist die Anzahl der Platten, auf denen eine Induktion, bzw. keine Induktion zu beobachten war.)

Zellhomogenat (Spenderstamm)	Empfänger-stamm	Induktion	keine Induktion
271	260	-	10
	261	6	4
	270	-	10
	273	4	6
	301	-	10
291	260	2	8
	261	6	4
	270	-	10
	273	10	-
	301	-	10
311	260		10
	261	2	8
	270	-	10
	273	10	-
	301	-	10

Tabelle: 20

Induktion der Konidienbildung bei konidienfreien Stämmen (Empfängerstämme) durch Zusatz von zellwand- und partikelfreiem Zellhomogenat homokaryotischer Konidienbildner.
(Dargestellt ist die Anzahl der Platten, auf denen eine Induktion, bzw. keine Induktion zu beobachten war.)

Zellhomogenat (Spenderstamm)	Empfänger-stamm	Induktion	keine Induktion
291 kernhaltig	260	3	7
	261	7	3
	270	-	10
	273	10	-
	301	1	9
291 kernlos	260	1	9
	261	5	5
	270	-	10
	273	10	-
	301	-	10

Tabelle: 21

Wirkung von kernhaltigem und kernlosem Zellhomogenat des Stammes 291 auf die Induktion der Konidienbildung bei konidienfreien Stämmen.

Zellhomogenat (Spenderstamm)	Empfänger-stamm	Induktion	keine Induktion
311 kernhaltig	260	-	10
	261	3	7
	270	-	10
	273	10	-
	301	-	10
311 kernlos	260	1	9
	261	2	8
	270	-	10
	273	10	-
	301	-	10

Tabelle: 22

Wirkung von kernhaltigem und kernlosem Zellhomogenat des Stammes 311 auf die Induktion der Konidienbildung bei konidienfreien Stämmen
(Dargestellt ist die Anzahl der Platten, auf denen eine Induktion, bzw. keine Induktion zu beobachten war.)

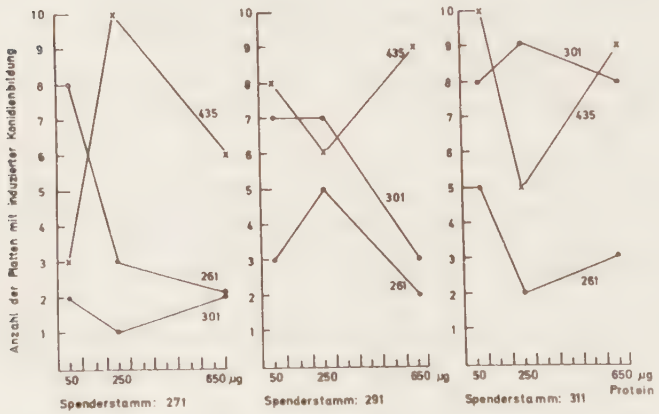


Abbildung: 48 Induktion der Konidienbildung durch Proteinfraktionen aus verschiedenen Konidienbildnern bei konidienfreien Stämmen.
Abhängigkeit der Induktion von der Konzentration des Spenderproteins.

Aus der Abb. 48 geht hervor, daß der Stamm 261 beim Angebot der Proteinfraktionen der Stämme 271 und 291 nur auf niedrige Konzentrationen mit einer Induktion der Konidienbildung reagiert. Auch beim Spenderstamm 311 kann diese Tendenz angenommen werden, da die geringe Erhöhung der Induktion beim Angebot von 650 µg Protein noch im Fehlerbereich der Methode liegt. Der Stamm 301 reagierte auf die Spenderproteine 271 und 311 konzentrationsabhängig. Im ersten Fall ist die Induktion nur schwach; der Stamm reagiertedeutlich auf die Proteine des Stammes 311 und 291, wobei wieder niedrige Proteinkonzentrationen am wirksamsten waren. Das Verhalten des Stammes 435 läßt sich schwer erklären, es sei denn, man nimmt an, daß verschiedene Regulationsmechanismen bei den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen angesprochen werden.

3.3. Pigmentbildung

Bei vielen Mikroorganismen ist die Pigmentbildung ein auffälliges Merkmal (FAY, 1969). Ihr Fehlen oder Vorhandensein läßt auf morphologische oder physiologische Eigenschaften schließen, was der Identifizierung von Organismen dienen kann (KORTH und PULVERER, 1971) oder auch zur Deutung ihrer Lebensweise (MASSOW und SCHMID, 1973). Insbesondere bei den Pilzen ist die Pigmentbildung ein wichtiger morphogenetischer Prozess und ein systematisches Merkmal. Bei den Pigmenten der Pilze handelt es sich um chemische Verbindungen verschiedenster Art und Herkunft. Abgesehen von den wichtigsten Pigmenten ist über die Aufgabe dieser Stoffe in den Zellen noch sehr wenig bekannt. Zu den wichtigsten Pigmenten gehören die Karotinoide (Übersicht bei RÖHRSCHEIDT und TARNOK, 1972) und die Cytochrome (Übersicht bei AINSWORTH und SUSSMAN, 1966). Cytochrom C wird im Zusammenhang mit der Photosporogenese erwähnt. Die Mycochrome haben als Photorezeptoren auch für B o t r y t i s eine Bedeutung und sind auf der Innenseite der Zellwand (hauptsächlich Sporenzellwand) lokalisiert (JAFFE und ETZOLD, 1962; HONDA, 1969; KUMAGAI, 1969). Melanine, die als Lichtschutzpigmente auch in tierischen und menschlichen Geweben vorkommen, finden sich bei Mikroorganismen häufig in Überdauerungsorganen, die dann eine schwarze oder braune Farbe aufweisen. Der Syntheseweg ist bekannt:

Tyrosin ⟶ Dihydroxyphenylalanin ("Dopa") ⟶ Dopachinon ⟶ (Dopachrom) ⟶ Indolchinon ⟶ (Polymerisation) ⟶ Melanin

Diese Formulierung stellt nur eine Vereinfachung eines sehr komplexen Vorgangs dar, denn NICOLAUS et al. haben nachgewiesen, daß es eine ganze Reihe von Melaninen gibt, die sich geringfügig voneinander unterscheiden, wenn sie nach alkalischer Hydrolyse auf ihre Spaltprodukte hin untersucht werden

NICOLAUS et al., 1964; HOROWITZ und BEADLE, 1943; HOLLIS, 1952; LERNER, 1953; DOUGLAS und SAN CLEMENTE, 1956). Bei U s t i l a g o schlossen die Autoren auf drei verschiedene Melanine, die - wie fast alle pflanzlichen Melanine - dem Katecholtyp angehören. Auch bei B o t r y t i s handelt es sich bei dem braunen Farbstoff der Konidien und Sklerotien um ein nicht näher beschriebenes Melanin. Zusammenhänge zwischen Pigmentierung der Überdauerungsorgane, Konidienbildung und Abscheidung von Farbstoffen in das Medium sind bei B o t r y t i s bisher noch nicht eingehend untersucht worden. Es lag daher nahe, im Zusammenhang mit den Versuchen über die Konidienbildung auch die Pigmentsynthese und ihre Bedeutung für die Sporulation zu bearbeiten, zumal FARO (1972) und SCRIBNER et al. (1973) gefunden haben, daß das Auftreten von Pigmenten in Regionen der Kultur, in denen Fruchtkörper oder Sporen zu erwarten sind, zu einem wichtigen morphogenetischen Schritt der Fruktifikation oder der Sporulation gehört. Die Abgabe von Pigmenten steht daher nicht am Ende eines Differenzierungsschrittes sondern am Anfang und muß als möglicher Faktor für die Auslösung der Konidienbildung in Erwägung gezogen werden. Die Methode, Stämme mit den entsprechenden Eigenschaften zu isolieren, ermöglichte es, diese Fragestellung zu bearbeiten.

Die Wildtypen zeigten alle die typische Braunfärbung der Mycelien, der Konidien, der Sklerotien und des älteren Mediums. Je nach Konidiendichte des Impfflecks begann sich nach etwa 8 Tagen das Medium in konzentrischen Ringen um den Impfort herum zu verfärben. 24 bis 48 Stunden später setzte die Konidienbildung ein. Je niedriger die Sporentiter waren, desto weiter lagen beide Prozesse zeitlich auseinander. Die Analyse der Nährmedien ergab, daß die gefärbten Regionen Aminosäuren, Proteine und Oxydasen enthielten und der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 420 nm hat. Da sich bei Tyrosingaben eine Intensivierung der Farbstoffbildung zeigte, die linear mit der Tyrosinmenge zunahm (Abb. 49) konnte auf Melanine geschlossen werden.

Im zellfreien Zellextrakt wurde mit der DOPA-Reaktion die Tyrosinaseaktivität bestimmt. Hierbei ergab sich ein Maximum der Aktivität in Kulturregionen, in denen erst 24 bis 48 Stunden später Pigmente in das Medium abgegeben wurden. Es besteht also eine Korrelation zwischen beiden Prozessen, jedoch ist eine bestimmte zeitliche Verschiebung hierbei zu berücksichtigen.

Eine weitere Beziehung besteht zwischen der Pigmentierung und der Abgabe von Oxydasen in das Medium. Abb. 51 zeigt den raschen Anstieg der Oxydasen bis zum 7. Tag, erst dann setzt die Pigmentierung ein und die Oxydasen nehmen stetig ab. Dieses Phänomen ließ sich im Zusammenhang mit der phytopathogenen Lebensweise des Pilzes in der Natur erklären. Gerade in den ersten Tagen nach der Keimung werden Oxydasen benötigt, um den Infektionsvorgang zu erleichtern und das Wachstum im Gewebe der Wirtspflanze zu ermöglichen. Danach schützt sich der Pilz gegen den Angriff des Wirtes durch seine Pigmentierung: nach Ansicht von KUO und ALEXANDER (1967) bewahrt das Melanin ihn vor der Lyse durch Chitinasen.

Die geschilderten Ergebnisse sind nun bei den einzelnen Stämmen überprüft worden. Allein die Tatsache, daß es pigmentfreie Stämme gibt, die durchaus in der Lage sind, Konidien zu bilden (Abb. 51), beweist, daß eine Kopplung beider Prozesse bei B o t r y t i s nicht vorliegt. Der konidienfreie Stamm 260, bei dem diese Beobachtung am deutlichsten zu machen war, zeigte schon nach 4 Tagen bei einer geimpften Konidiendichte von 10^3 Sporen/ml eine intensive Schwarzfärbung des Mediums. Die Abb. 50 zeigt die Intensität der Pigmentbildung bei einigen Stämmen und verdeutlicht, wie unterschiedlich intensiv dieses Merkmal ausgebildet wird. Die Intensität der Pigmentsynthese war über viele Generationen hin stammspezifisch. Je dichter die Konidien auf einer Platte lagen, desto intensiver wurde die Verfärbung des Mediums (Abb. 53). Diese Werte waren im Zusammenhang mit der puromycininduzierten M[illegible]neubildung wichtig, über die später berich-

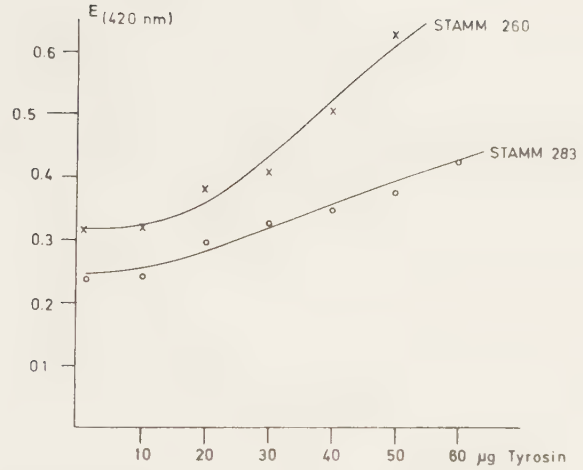


Abbildung: 49

Intensivierung der Pigmentbildung nach Zusatz von Tyrosin in das Medium

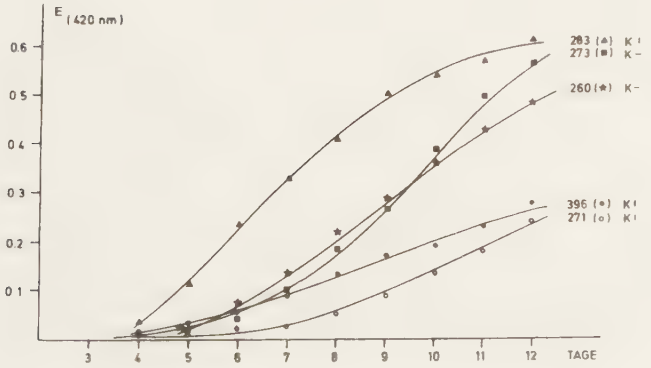


Abbildung: 50

Intensität der Pigmentbildung bei einigen Stämmen
(K! = Konidienbildner, K - = konidienfreier Stamm)

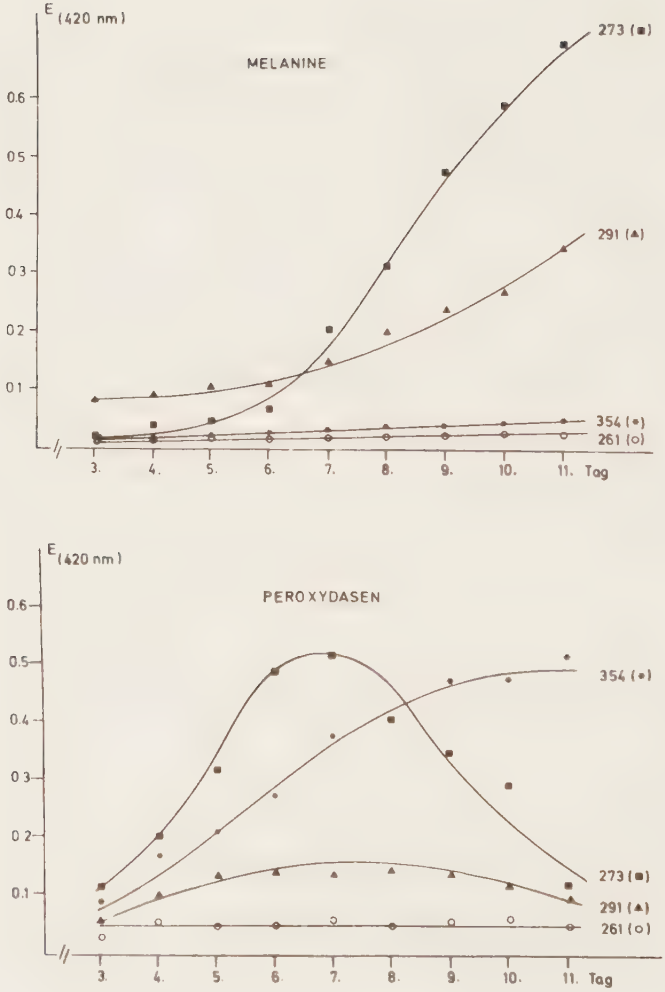


Abbildung:51 Zeitliche Korrelation zwischen Pigmentbildung und Peroxidaseabscheidung in das Medium bei einigen Stämmen

tet wird.

Auf Dauerlicht reagierten die Stämme unterschiedlich stark, wie es am Beispiel der Stämme 401 und 420 gezeigt ist (Abb.52).

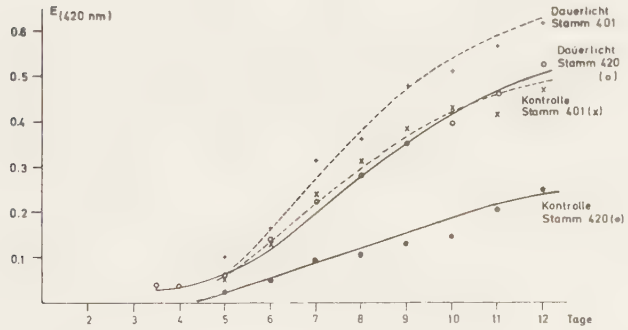


Abbildung: 52

Intensivierung der Pigmentbildung durch Dauerlicht bei den Stämmen 401 und 420

Allen pigmentfreien Stämmen gemeinsam war das Verhalten gegenüber dem Zusatz von Tyrosin in das Medium : die Pigmentbildung blieb aus (im Gegensatz zum Wildtyp, der verfrühte Pigmentbildung zeigte). Daraufhin sind die Stämme untersucht worden, ob sie Tyrosinase und Oxydasen in das Medium abgeben. Bis auf die Stämme 262, 270 und 301 war Tyrosinase bei den pigmentfreien Stämmen im Medium nicht nachweisbar, ebenso fehlten bei den getesteten Stämmen die Oxydasen im Medium, obwohl sie sich im Plasma (zellfreier Zellextrakt) nachweisen ließen.
Unter den Pigmentbildnern hatten die Stämme 291 und 396 keine Tyrosinase. Ihre Pigmente, insbesondere die der Sklerotien

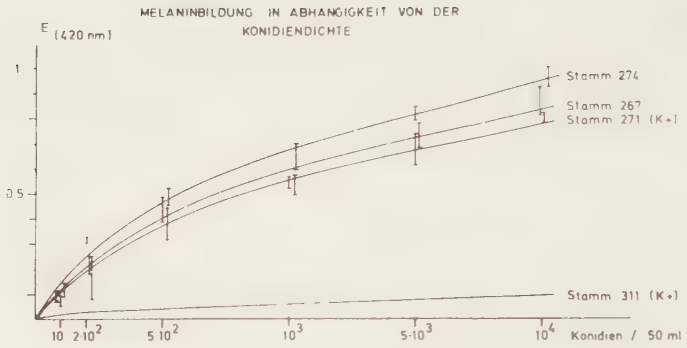


Abbildung: 53 Melaninbildung in Abhängigkeit von der Konidiendichte

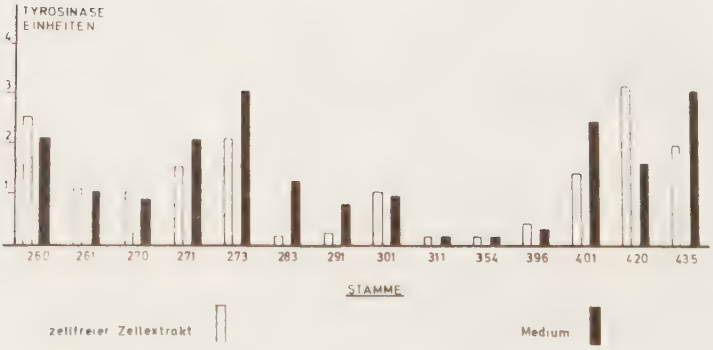


Abbildung: 54 Tyrosinasegehalt des Nährbodens und des zellfreien Zellextrakts der Stämme

könnten auf einem anderen biochemischen Weg entstanden sein, wie er bei Bakterien und bei A s p e r g i l l u s beschrieben wurde (LERNER, 1953; DOUGLAS und SAN CLEMENTE, 1956). Dieser Weg führt vom Tyrosin über eine Decarboxylierung zu einem braunen Farbstoff, der Melanineigenschaften ausweist, als solches aber noch nicht näher charakterisiert worden ist. Die mehr hellbraunen Pigmente der Stämme 301 und 435 könnten eventuell solche Pigmente sein, ebenso sprach die Beobachtung am Stamm 291 dafür, der zwar keine Pigmente in das Medium abgab, dessen Sklerotien längere Zeit weiß blieben, aber etwa 5 Tage nach ihrem Entstehen die charakteristische Schwarzfärbung zeigten. Die Zugabe von Tyrosin in das Medium führte zu einer schwachen Pigmentierung des Nährbodens trotz Abwesenheit von Tyrosinase im Medium und im zellfreien Zellextrakt.

Die Ergebnisse lassen nun vermuten, daß es sich bei den pigmentfreien Stämmen um tyrosinasedefekte Mutanten handeln könnte. Es besteht aber noch eine weitere Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären. In einigen Fällen konnte bei den pigmentfreien Stämmen nachgewiesen werden, daß Tyrosin in nur ganz geringer Menge im zellfreien Zellextrakt vorhanden war. Auch die Zellwand enthielt beim Stamm 261 keine nachweisbaren Tyrosinmengen. Somit könnte der Mangel an genügendem Tyrosin die Ursache für die fehlende Pigmentsynthese sein, also auf eine Transaminasemutante geschlossen werden oder auf einen Fehler im Syntheseweg vom Shikimisäure-5-phosphat zum Tyrosin.

Der Pigmentsynthesefehler ließ sich elektrophoretisch nicht charakterisieren, ebenso wie sich die Pigmentbildner im Gegensatz zu den Konidienbildnern nicht durch eine distinkte Bandenzusammensetzung in den Pherogrammen auszeichneten.

Die Tab. 23 faßt die Ergebnisse aller Versuche über den Komplex der Pigmentbildung zusammen und gibt Auskunft über die zeitliche Folge der Tyrosinaseaktivität und gleichzeitig über die Zusammenhänge zwischen Oxydaseabscheidung in das Medium bei vorhandener und nicht vorhandener Pigmentsynthese. Aus

		Konidien	Pigmente		Tyrosin			Tyrosinase		Reaktion auf Tyrosin	Oxydasen im Nährboden
			Nährboden	Mycel	Nährboden	Plasma	Zellwand	Nährboden	Plasma		
WT	4. Tag	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	10. "	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Pigmentbildner:											
260	4. Tag	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
	10. "	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
271	4. Tag	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
	10. "	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
273	4. Tag	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	10. "	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
283	4. Tag	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	10. "	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
291	4. Tag	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	10. "	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
301	4. Tag	-	-	-	-	+	+	+	?	-	?
	10. "	+	+	?	-	+	+	+		-	
396	4. Tag	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
	10. "	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
401	4. Tag	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	10. "	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
420	4. Tag	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	10. "	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
435	4. Tag	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
	10. "	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
ohne Pigmente:											
261	4. Tag	-	-	-	-	(-)	-	+	+	-	-
	10. "	-	-	-	-	(+)	-	+	+	-	+
270	4. Tag	-	-	-	-	+	+	+	?	-	?
	10. "	-	-	-	-	+	+	+		-	
311	4. Tag	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-
	10. "	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-
324	4. Tag	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	10. "	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+

Tabelle: 23

dieser Tabelle geht hervor, daß für den pigmentfreien Stamm 261 der Mangel an Pigmenten auf einen Tyrosinmangel zurückzuführen sein könnte, zumal Tyrosinase vorhanden ist. Bemerkenswert ist jedoch, daß dieser Stamm auf Tyrosingaben negativ reagierte. Ein Tyrosinasedefekt könnte bei den Stämmen 311 und 354 vorliegen, bei ihnen war keinerlei Tyrosinase nachzuweisen und ihre Reaktion auf Tyrosin blieb negativ.

Aber auch unter den Pigmentbildnern gibt es tyrosinasedefekte Stämme: 291 und 396. Tyrosinmangel ist bei den Stämmen 273, 401 und 420 festgestellt worden. Bemerkenswert erschien, daß bei intensiver Pigmentsynthese kaum noch Tyrosin in der Zellwand nachzuweisen war (260, 273, 283, 401 und 435), insbesondere bei älterem Mycel. In jüngeren Organismen fand sich in den Zellwänden Tyrosin in nachweisbaren Mengen.

Diese Ergebnisse wurden durch Versuche mit dem Translationshemmstoff Puromycin wesentlich erweitert und einer Interpretation zugänglich gemacht, da hierdurch Aussagen über die Regulation der Pigment- und Konidienbildung möglich waren. Daher seien an dieser Stelle die Puromycin-Experimente hier eingefügt.

3.4. Versuche mit Puromycin

In Konzentrationsreihen ist am Wildtyp getestet worden, welche Wirkungen das Antibiotikum auf den Organismus hat. In fast allen Fällen blieb eine deutliche Reaktion auf das Antibiotikum aus. Aus 35 Einsporkulturen zeigten lediglich 3 eine Verformung der Spitzenzellen und 25 eine deutlich niedrigere Wachstumsrate sowie eine Tendenz zu multipler Verzweigung. Nach Entzug des Puromycins stellte sich wieder normales Wachstum ein.

Auch bei den Stämmen blieb eine sichtbare Reaktion zunächst aus. Daher wurden vorgequollene Sporen, bei denen innerhalb der nächsten Stunde die Ausbildung der Keimhyphe zu erwarten war, mit Puromycin verschiedener Konzentrationen behandelt. Die Wachstumsraten der Keimhyphen lagen jetzt wesentlich unter denen der Kontrollen. Hierbei zeichnete sich eine Konzentrationsabhängigkeit ab. Die höchste Dosis, bei der noch Wachstum erfolgte, lag bei 250 bis 350 µg/ml. Dies ist eine ungewöhnlich hohe Dosis im Vergleich zu anderen Experimenten mit Puromycin (BARATHOVA et al.; 1969). Die niedrigste Dosis, bei der noch eine Wachstumshemmung meßbar war, lag bei 40 µg/ml. Je höher der Sporentiter im Hemmversuch war, desto geringfügiger waren die Schäden. Die Abb. 55 verdeutlicht diesen Zusammenhang an Hand der prozentualen Verringerung der Wachstumsraten nach Puromycineinwirkung.

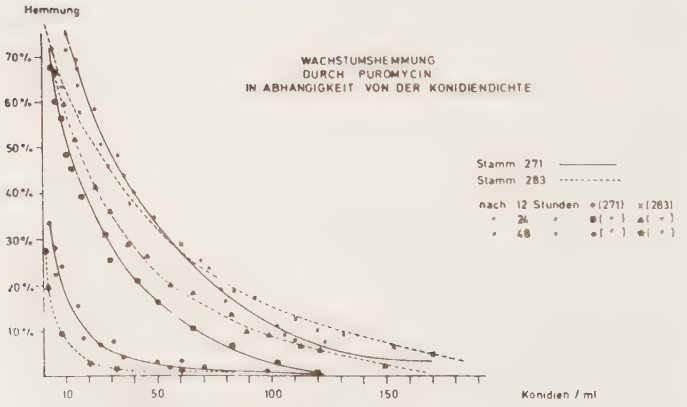


Abbildung: 55

Mit diesen Ergebnissen ist nochmals versucht worden, beim Wildtyp eine Hemmung durch Puromycin zu erreichen. Die Keimmycelien, die aus heterokaryotischen vielkernigen Sporen entstanden sind, waren durch Puromycin in Konzentrationen von 40 bis 250 µg/ml nicht beeinflußbar.

Die Stämme reagierten unterschiedlich auf den Translationshemmstoff. Die Wirkung hätte auf einem echten Translationsschaden beruhen können, sich aber auch mit einem Sekundäreffekt erklären lassen, wobei die Hemmung des Wachstums als Folge des Einflusses sekundärer Stoffwechselprodukte zu verstehen wäre, die unter dem Einfluß von Puromycin nachweislich vermehrt in das Medium abgegeben wurden. An drei verschiedenen Stämmen (260, 273 und 354) konnte jedoch nachgewiesen werden, daß Puromycin tatsächlich in die Zellen eindrang. Nach chromatographischer Auftrennung des zellwandfreien Zellhomogenats ließ sich das Antibiotikum unter der UV-Lampe sichtbar machen.

Die Abb.56/57 zeigen die regelmäßig zu beobachtenden Veränderungen der Morphogenese nach Hemmstoffzugabe.

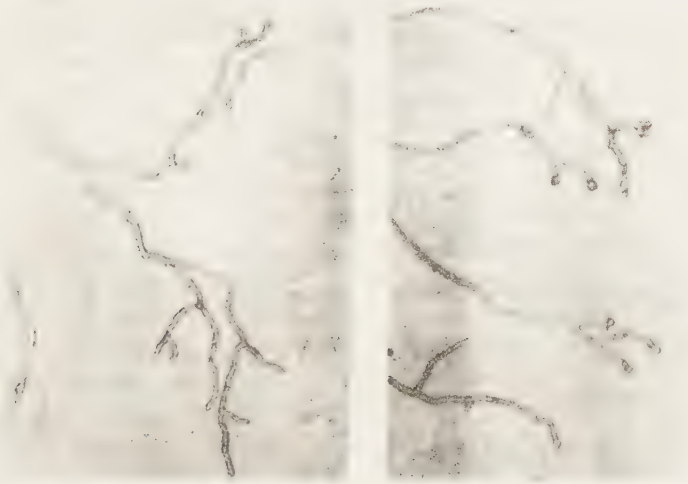


Abbildung: 56 Veränderung der Spitzenzellen nach Puromycineinwirkung

Abbildung: 57 Multiple Verzweigungen nach Puromycin-Behandlung

Die Haupthyphen verloren teilweise ihre Apikaldominanz, wodurch multiple Verzweigungen entstanden. Die Kulturoberfläche wirkte demzufolge stets rauh. Die beiden wichtigsten morphologischen Phänomene, die nach Puromycinbehandlung zu beobachten waren, sind die verfrühte Konidienbildung der behandelten Stämme (im Fall des Stammes 260, der sonst konidienfrei ist, sogar eine Induktion der Konidienbildung) und eine Induktion der Pigmentbildung in allen Fällen (Abb. 59).Dies bedeutet, daß die Pigmentbildner unter Puromycineinwirkung eine I n t e n s i v i e r u n g der Pigmentsynthese zeigten und die pigmentfreien Stämme eine i n d u z i e r t e. Der Begriff "Induktion" bezeichnet in diesem Zusammenhang die Auslösung eines morphogenetischen Vorgangs, der normalerweise entweder gar nicht oder zu einem viel späteren Zeitpunkt der Entwicklung des Organismus zu beobachten ist. Eine Induktion wurde am leichtesten mit geringen Sporentitern oder an Einsporkulturen erreicht.

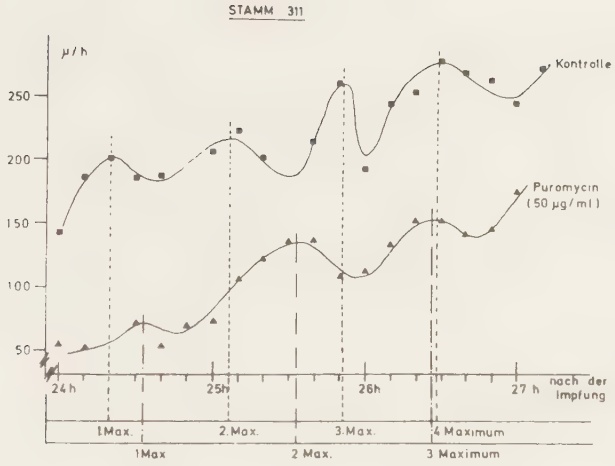


Abbildung: 58

Einfluß von Puromycin auf die Rhythmik des Wachstums: die Rhythmik verschiebt sich beim behandelten Organismus um etwa eine Phase.

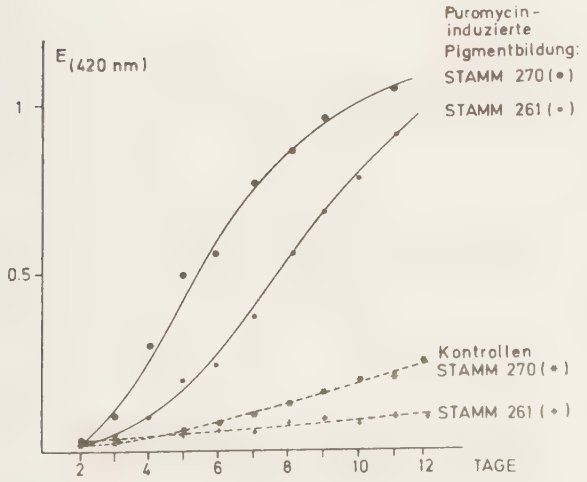


Abb.: 59

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, die in Tab.23 aufgeführt worden sind, so fällt auf, daß Puromycin auch dann zu einer Induktion der Pigmentbildung führte, wenn keine nachweisbaren Mengen an Tyrosin oder Tyrosinase vorhanden waren. Die puromycinbehandelten Zellen enthielten grundsätzlich wenig Tyrosin in ihren Zellwänden.

Folgende Beobachtungen sprechen dafür, daß Puromycin in den behandelten Zellen von B. c i n e r e a tatsächlich als Translationshemmstoff wirkt:

Die elektrophoretische Auftrennung der Plasmaproteine nach Behandlung mit Puromycin zeigte, daß sich beim Wildtyp das Bandenmuster nur geringfügig verschob, was im Bereich der Fehler der Methode liegt. Bei den Stämmen jedoch, die empfindlich auf das Antibiotikum reagierten, war eine Veränderung des Bandenmusters nachzuweisen (Abb.60 und 61).

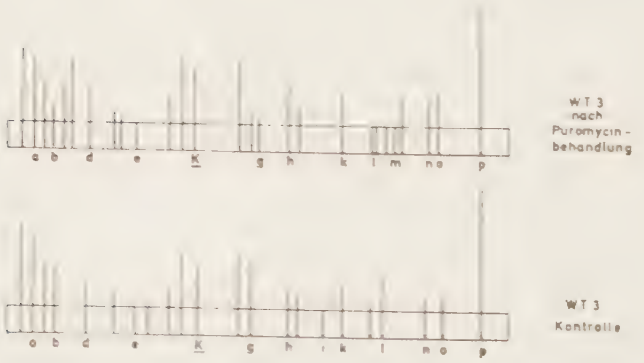


Abbildung 60 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine des Wildtyps nach Puromycinbehandlung

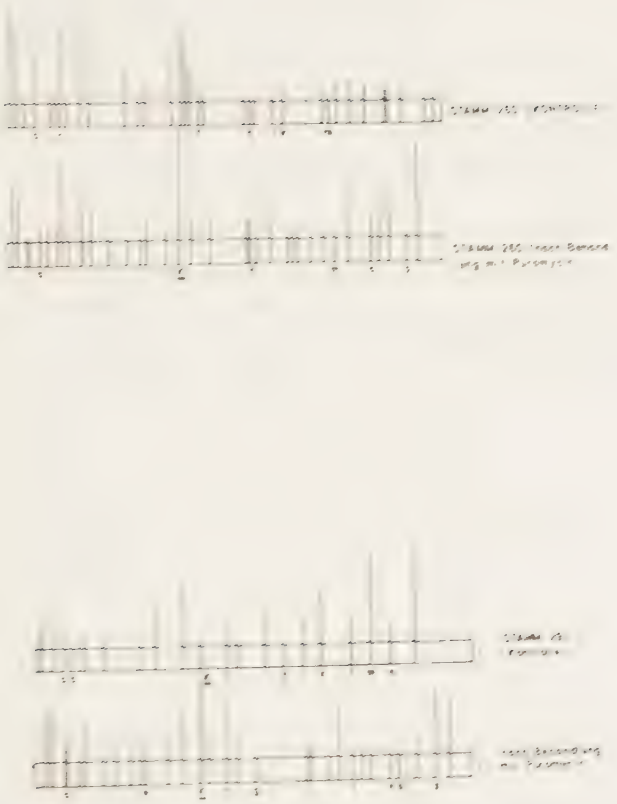


Abbildung: 61 Elektrophoretische Auftrennung der Cytosolproteine zweier Homokaryonten nach Puromycin-behandlung

Im niedermolekularen Bereich traten mehr Banden auf als in den Kontrollen. Die Extinktion einiger dieser Banden war besonders hoch. Beim Stamm 260 induzierte Puromycin eine Konidienbildung. Die Banden, die bei der Kontrolle im Bereich K liegen, fehlten nach der Puromycinbehandlung und statt dessen ließ sich eine starke K Bande nachweisen. Weniger deutlich waren die Ergebnisse beim Stamm 291. Die Tendenz, daß mehr niedermolekulare Polypeptide durch den Einfluß von Puromycin auftraten, blieb bei allen Stämmen reproduzierbar; nicht reproduzierbar hingegen waren Intensität und Rf-Werte der neuen Banden im Elektropherogramm.

Einen weiteren Hinweis dafür, daß Puromycin als Translationshemmstoff wirkte, gab die veränderte Aminosäurekomposition der Plasmaproteine (Abb.62)

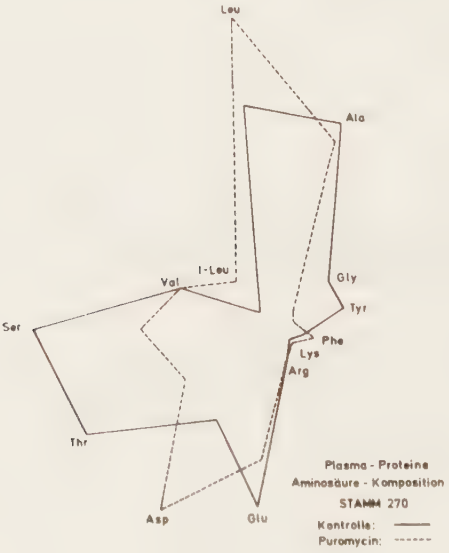


Abbildung: 62

Veränderung der Aminosäurekomposition der Plasmaproteine nach Puromycin-Behandlung

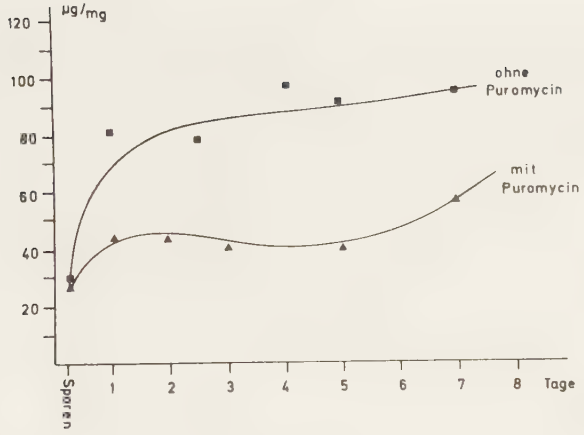


Abbildung: 63 Proteingehalt der Hyphen nach Puromycinbehandlung

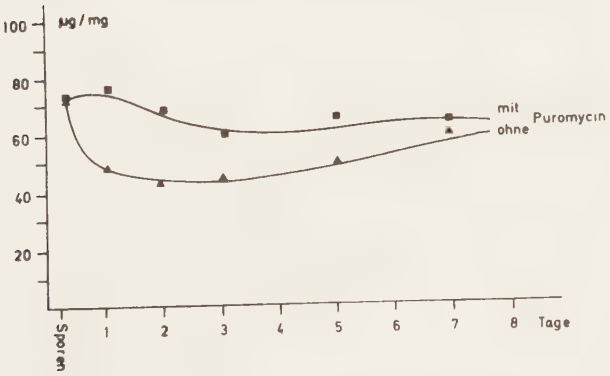


Abbildung: 64 RNS-Gehalt nach Puromycingehalt

Die Abbildungen 63 u.64 weisen darauf hin, daß sich im Plasma von behandelten Zellen die bei Puromycinbehandlung typischen Erscheinungen nachweisen lassen: eine verminderte Proteinsynthese und erhöhter RNS Gehalt.

Nachdem beobachtet worden war, daß sich die Pigmentierung nach Puromycinbehandlung intensivierte, wurde nachgeprüft, welche Substanzen neben Melaninen noch an das Medium abgegeben werden. Hierbei stellte sich heraus, daß insbesondere Aminosäuren in der Nährlösung vermehrt zu finden waren (Abb. 65) und kurz vor der Konidienbildung der Nachweis von Ribose und nukleotidhaltigem Material positiv wurde. In den Kontrollen lag der Anteil von Ribose bei 30 µg/ml, er stieg auf 56 - 68 µg/ml nach Puromycinbehandlung an.

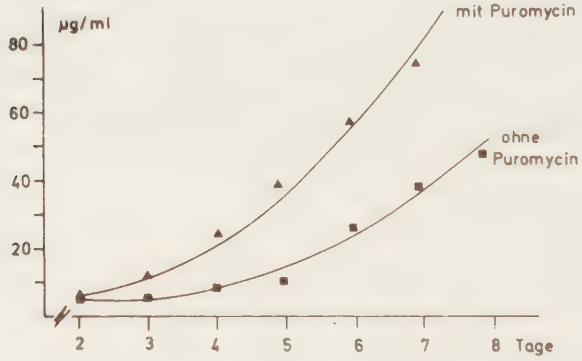


Abbildung: 65 Anstieg des Aminosäuregehalts des Nährbodens bei puromycinbehandeltem Material

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß eventuell die Induktion morphogenetischer Prozesse unter dem Einfluß von Puromycin auch auf einer Änderung der Zellwandpermeabilität beruhen könnte, sodaß bei erhöhter Permeabilität der Zellwand ein intensiverer Austausch der Nährstoffe stattfindet. Sowohl die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung behandelter Zellen als auch die Beobachtungen der Zelldeformierungen nach der Behandlung mit Puromycin, wie-

sen auf diese Möglichkeit hin. Die Bestimmung der Zellwandpermeabilität mit Fluoreszenzfarbstoffen hat ergeben, daß die Vermutung zutraf. Selbst unter Berücksichtigung, daß es sich bei dieser Methode um eine einfache und grobe Methode handelt, konnte mit einiger Sicherheit gezeigt werden, daß puromycinbehandelte Hyphen den Farbstoff schneller und intensiver aufnahmen als unbehandelte (Tab. 24).

Methode a (siehe Seite 40)

	Δt (sec)					
	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	
Kontrollen:	22	29	33	40	42	sec
behandelte Hyphen:	10	15	13	23	27	sec

(k_1 - k_5= verschiedene Acridinorangekonzentrationen)

Methode b (siehe Seite 41)

t_1 für alle Kontrollen: 25 sec		
Acridinorange-konzentration	Fluoreszenz nach 10 sec positiv	negativ
1 : 1,2 . 10^3	12	3
1 : 1,3 . 10^3	5	10
1 : 1,35. 10^3	7	8
1 : 1,38. 10^3	14	1
1 : 1,4 . 10^3	11	3
1 : 1,45. 10^3	10	5
Summe:	59	30

Tabelle: 24

Zeitlich schnellere und intensivere Aufnahme eines Fluoreszenzfarbstoffes durch die Hyphen nach der Behandlung mit Puromycin

Über die Pigmentbildung bei B. c i n e r e a lassen sich aus den geschilderten Ergebnissen folgende Aussagen gewinnen:

1. Die Pigmentierung kann über verschiedene Synthesewege ablaufen.
2. Auch bei Tyrosinmangel findet eine Pigmentsynthese statt. Das Ausgangsprodukt dieser Synthese könnte Phenylalanin sein.
3. Die auslösenden Faktoren der Pigmentbildung werden insbesondere nach Einwirkung von Puromycin wirksam.
4. Unter dem Einfluß von Puromycin sind in der Zelle mehr Aminosäuren und mehr Ribonukleinsäuren als sonst üblich vorhanden. Diese zusätzlich oder vermehrt auftretenden Aminosäuren oder auch das nukleotidhaltige und an Ribose reiche Material könnten eine induktive Wirkung auf morphogenetische Prozesse, insbesondere auf die Pigmentbildung haben.
5. Die fehlende Pigmentbildung ist damit bei den pigmentfreien Stämmen eher auf einen Regulationsfehler als auf einen enzymatischen Defekt zurückzuführen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von vergleichbaren Untersuchungen über die Morphogenese bei Pilzen dadurch, daß sie versuchte, das Untersuchungsobjekt nicht nur in seinen einzelnen Entwicklungsstadien zu charakterisieren, um daraus Gesetzmäßigkeiten morphogenetischer Prozesse abzuleiten, sondern das Objekt als biologisches System mit austauschbaren, mehr oder weniger autonomen Komponenten zu betrachten. Zu den "Komponenten" dieses heterokaryotischen Systems wurden dabei nicht nur die Kerne, die Ribosomen oder die cytoplasmatischen Faktoren gerechnet, sondern auch die Zellwand und die exogenen Faktoren. Jede heterokaryotische Konidie für sich stellt eine autonome Einheit dieses Systems dar. In ihr sind alle notwendigen Faktoren und Komponenten vorhanden, die bei günstigen Umweltbedingungen das Wachstum zu einem differenzierten Organismus ermöglichen. Aber die Tatsache, daß es sich um eine h e t e r o k a r y o t i s c h e Einheit handelt, führte zu der Frage, ob nicht allein jeder der Kerne zusammen mit einem entsprechenden Cytoplasmaanteil eine kleine Einheit für sich darstellt. Diese Frage entstand in Anlehnung an die Formulierung von HANSEN und SMITH (1932), in der eine Konidie schon als eine K o l o n i e unterschiedlicher Kerne angesprochen wurde. In den meisten Arbeiten über Heterokaryose bei Pilzen (siehe S. 6) wird eine Autonomie der zwei oder drei unterschiedlichen Kerntypen innerhalb eines Mycels angenommen. Bei Anhäufung des einen oder des anderen Kerntyps in einer bestimmten Mycelregion kommt es zu einer Änderung der Morphogenese oder gar zu Kernverschmelzungen und Parasexualität (AINSWORTH und SUSSMAN, 1966). Vielfach ist eine Sektorenbildung ein Hinweis für solche Vorgänge. Die Frage, ob und in welcher Weise sich die Kernprodukte der einzelnen Kerntypen gegenseitig beeinflussen, ist noch weitgehend ungeklärt. Eine Kombination von genetischen und biochemischen Untersuchungen an geeigneten Objekten, wie z.B. A s p e r g i l l u s, N e u r o s p o r a,

P e n i c i l l i u m oder P h y c o m y c e s, stellt einen der möglichen und bisher gut genutzten Versuchsansätze dar, mit dem diese Fragen beantwortet werden können. Genetische Vorgänge, insbesondere Kernverschmelzungen, erschweren jedoch die Interpretation solcher Versuche erheblich: durch die Verschmelzung der Kerne entsteht nämlich ein neues Regulationszentrum innerhalb des Heterokaryonten. Nur solche Heterokaryonten, bei denen keinerlei Sexualität festgestellt werden konnte, eignen sich für die Untersuchung der oben genannten Fragestellungen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist ersichtlich, daß der gedankliche Ausgangspunkt -die Isolierung von miteinander vergleichbaren Homokaryonten aus e i n e m heterokaryontischen System- in bestimmten Grenzen zum Ziel geführt hat. Über die Vielkernigkeit als Ursache der Varianz bei B. c i n e r e a , über die endogene und exogene Regulation der Morphogenese und über die Wechselwirkungen solcher Faktoren, die zur Ausbildung morphogenetischer Merkmale führen, sind Ergebnisse gefunden worden, die im folgenden diskutiert werden sollen.

4.1. Varianz und Vielkernigkeit

Die Annahme von HANSEN UND SMITH (1932), daß die große Varianz von B. c i n e r e a - Kulturen von der Vielkernigkeit des Pilzes abhängt, kann nur dann akzeptiert werden, wenn auch die Interaktionen der Kernprodukte berücksichtigt werden. Tragen einige Kerne die genetische Information für die Synthese eines spezifischen Enzyms, so wird die Leistung dieses Enzyms durch die Enzymmenge und das dafür vorhandene Substrat bestimmt. Die Enzymmenge wiederum hängt von der Zahl der für das Enzym kodierenden Kerne ab. Das Enzym kann aber auch durch Produkte anderer Kerne kompetitiv gehemmt oder gar inaktiviert werden.

Da es möglich war, einkernige Keimmycelien herzustellen,

die sich zu einem lebensfähigen Organismus entwickelten, kann gesagt werden, daß j e d e r Kern der heterokaryotischen Spore eine genetische Grundausstattung enthält, die in jedem Kern möglicherweise vielfach vorhanden ist. Im Homokaryonten laufen alle physiologischen und cytologischen Leistungen zunächst ebenso ab wie im Heterokaryonten, wenn auch nicht mit der gleichen Geschwindigkeit. Dies mag an dem Verhältnis der Kernzahlen liegen: in den ersten 24 - 48 Stunden seiner Entwicklung ist ein Homokaryont b s zu 70 % an Kernen ärmer als der Heterokaryont; erst allmählich gleichen sich die Kernzahlen einander an. Demzufolge sind auch die Syntheseleistungen im Homokaryonten reduziert und er ist gegenüber Nährstoffmangel oder Temperatureinflüssen wesentlich empfindlicher als der Wildtyp. Einige der isolierten Homokaryonten zeigten auffällige morphologische Merkmale, was sie als Varianten gegenüber dem Wildtyp abgrenzte. Daraus könnte geschlossen werden, daß einige Kerne innerhalb der vielkernigen Spore bestimmte genetische Informationen für dieses Merkmal tragen und andere nicht. Es solte jedoch auch berücksichtigt werden, daß zwei einkernige Keimmycelien sich durchaus auch in ihrem Ploidiegrad unterscheiden können und dies die Varianz zwischen den Kulturen verursachen kann. Mehrere Beobachtungen sprechen dafür, daß der Heterokaryont Kerne unterschiedlichen Ploidiegrades enthält. EMEIS und WINDISCH (1960) haben an Hefen einen direkten Zusammenhang zwischen Kernwertigkeit und Kerngröße festgestellt. KOWALSKI (1971) hat lichtmikroskopisch an synchronisierten B. c i n e r e a -Kulturen beobachtet, daß die Kerne bereits im Keimmycel unterschiedlich groß sind. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Auftrennungen der Kernfraktionen im Dichtegradienten weisen ebenfalls darauf hin.

Es gab aber Hinweise dafür, daß sich zwei Homokaryonten mit identischen morphologischen Eigenschaften nach einigen Generationen doch in ihren Merkmalen voneinander unterscheiden. Einige nachweislich einkernige Isolate, die in den er-

sten drei Generationen keine Konidienbildung zeigten, begannen in der vierten Generation dieses Merkmal auszubilden. In den darauf folgenden Generationen intensivierte sich die Konidienbildung: ein Merkmal, das in den Ausgangskulturen nicht zu finden war, setzte sich allmählich durch.

CALPONZOS (1954) berichet, daß bei längerer "Zucht" von Ein- und Vielsporkulturen von *Cercospora musae* sich die Intensität und die Uniformität der Sporulation in den folgenden Kulturgenerationen steigerten. Er nahm an, daß hier ein "stufenweises Aussortieren durch Selektion" stattgefunden habe, vorausgesetzt, daß die Originalisolate heterokaryotisch waren. Der Kerntyp, der ein größeres Potential zu Sporenbildung hat, bleibt erhalten.

Diesen Gedanken hat JINKS (1954) aufgegriffen und festgestellt, daß die Ursache für eine solche "somatische Selektion" nicht im Kern sondern im Cytoplasma zu suchen ist. Seiner Meinung nach unterliegt das Cytoplasma der meisten Pilze einer wenig strengen Regulation durch den Pilzkern. Der Ablauf der Differenzierung und die somatische Selektion werden jedoch durch die Verteilung und die differentielle Verdopplung der Organellen bestimmt. CALPONZOS und JINKS erzielten ihre Ergebnisse an Heterokaryonten. Die oben geschilderte Beobachtung innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde jedoch am Homokaryonten gemacht. Zusammen mit den Ergebnissen aus Versuchen, in denen Hyphenstücke aus verschiedenen Differenzierungszonen übertragen wurden (siehe Seite 104), ergibt sich, daß JINKS die Bedeutung des Kerns unterschätzt hat und CALPONZOS den Einfluß des Cytoplasmas auf die Kerne zu wenig berücksichtigte.

Für *B. cinerea* kann sowohl beim Heterokaryonten als auch beim Homokaryonten eine gleichmäßige Verteilung der Kerne im Mycel angenommen werden. Bei unterschiedlicher Verteilung verschiedener Kerntypen im heterokaryotischen Mycel [illegible] kleiner Hyphenstücke aus [illegible]

schiedene Zonen verschiedene Varianten finden lassen, was jedoch nicht der Fall war. Es war gleichgültig, von wo Mycel abgeimpft wurde, die übertragenen und ausgewachsenen Mycelien glichen stets dem Ausgangsmaterial. Entscheidend für die Frage nach der Bedeutung der Kerne und des Cytoplasmas für die Morphogenese ist, wie sich das Mycelstück selbst nach seiner Übertragung weiterdifferenziert. Hierfür ist sowohl das Alter als auch der Ort, von dem es aus dem Mycelverband entnommen wurde, maßgebend. Innerhalb der Entwicklung gibt es einen Zeitpunkt, zu dem sich die Zellen in einem physiologischen Zustand der Irreversibilität befinden. Ein bereits eingeleiteter morphogenetischer Prozess ist dann nicht mehr umkehrbar. Ist die Differenzierung erfolgt, so verhalten sich die übertragenen Mycelstücke wie Keimschläuche und wachsen zu einem jungen Mycel aus.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei B. c i n e r e a sowohl im Hetero- als auch im Homokaryonten einmal die Komplementation von Kernprodukten und zum anderen die somatische Selektion zur Ausbildung eines morphogenetischen Merkmals führen kann, wobei die Ursachen zur somatischen Selektion im Ursprung extranuklear sind.

4.2. Endogene Regulation der Morphogenese

Schon bei der Erörterung des Zusammenhangs von Vielkernigkeit und Varianz kam zum Ausdruck, daß regulative Vorgänge die Variabilität des Phänotyps stark beeinflussen. Endogene Regulationläuft auf genetischer, physiologischer und enzymatischer Basis ab und betrifft die Kernaktivität (Ribosomensynthese, DNS-Replikation, Transskription), die Kernteilung, Die Genaktivität (ebenfalls Transskription), die Proteinsynthese, die Synthese und Replikation von Organellen einschließlich der Zellwand und schließlich den Zellstoffwechsel. Das Ergebnis der endogenen Regulation ist ein cytologisches und physiologisches Gleichgewicht innerhalb der Zelle und

innerhalb des Gesamtorganismus. Durch die Gegenüberstellung verschiedener Homokaryonten, durch Hemmversuche mit Puromycin, durch elektrophoretische Charakterisierung der Proteine und durch Übertragungsversuche sollte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, wie sich die endogene Regulation der Morphogenese im vielkernigen System abspielt.

Das erste Stadium, in dem alle genannten Aktivitäten Voraussetzung für den Beginn eines Entwicklungszyklus sind, stellt die Keimung der ruhenden Spore dar. Bei Anwesenheit von Wasser mit einem geringen Glukose- oder Saccharosegehalt erfolgte bei B. c i n e r e a stets eine Quellung der Spore mit anschließender Keimung. Die ruhende Spore benötigte weder bestimmte Nährstoffe noch definierte Aminosäuren für die Keimung. Ihre cytoplasmatische Zusammensetzung und die molekulare Ausstattung der Spore ermöglichte also bei entsprechendem Quellungszustand der Spore eine Aktivierung des Stoffwechsels und eine Neusynthese von Zellwand. Eine Parallele hierzu ist A s p e r g i l l u s f u m i g a t u s, bei dem die Sporenruhe ebenfalls durch ernährungsphysiologisch neutrale Faktoren beendet wird(MANDELS, 1963). Bei diesem Organismus ist eine endogene Regulation während der Keimung durch den Verbrauch von internen Nährstoffreserven, insbesondere von Lipiden, gekennzeichnet. (CAMPBELL, 1971). Bei einigen anderen A s p e r g i l l u s - Arten und bei hefeartigen Pilzen ist der Verbrauch von Trehalose bei der Keimung charakteristisch (AITKEN und NIEDERPRUEM, 1970;). Trehalose hat während der Keimung und Differenzierung von D i c t y o s t e l i u m eine regulative Funktion (CLEGG und FILOSA, 1965). Sie stimuliert die Bildung der Trehalose-6-Phosphat-Synthetase (ROTH und SUSSMAN, 1968). Diese Stimulation beruht auf einer vorausgegangenen Synthese einer spezifischen RNS (ROTH et al. 1968), die ihrerseits Teil eines Differenzierungsablaufs über eine spezifische Genaktivierung ist. Die Auffassung von KILLICK und WRIGHT (1974) wird durch dieses Beispiel unterstützt. Die Autorinnen

schreiben den Proteinen bei der Regulation der Morphogenese lediglich katalytische Funktionen zu , den Kohlenhydraten jedoch regulative. Bei höheren Pilzen wurde der große Bedarf an ATP in allen Stadien der Keimung nachgewiesen, jedoch fehlen den ruhenden Sporen die hierfür notwendigen Phosphatasen und die Enzyme des EMBDEN-MEYERHOF-Stoffwechselweges. GOTTLIEB und CALTRIDER (1966), SHEPHERD (1957) und NISHI (1961) konnten zeigen, daß die Hydrolyse von Polyphosphaten und Lipiden in der ruhenden Spore diese Stoffe bereitstellt und eine Keimung ermöglicht. Die besonders wichtige Funktion der Glukose bei der Keimung im Zusammenhang mit der Zellwandneusynthese ist von Burger et al. ;1972) an Uredosporen von P u c c i n i a festgestellt worden. Immerhin besteht das Keimschlauchmaterial zu etwa 70 % aus Kohlenhydraten (JOPPIN et al., 1971). Der Glukosebedarf wird im Keimungsstadium hauptsächlich aus den internen Reserven der Spore gedeckt, jedoch scheint eine vorübergehende Aufnaheme von extern angebotener Glukose den Kohlehydratstoffwechsel zu stimulieren. Eine solche Stimulation sollte als regulativer Vorgang bezeichnet werden. Sie besteht auch bei B. c i n e r e a, wie es die Keimungsversuche gezeigt haben: Glukose oder Saccharose sind unbedingt für die Keimung der Konidien notwendig. Auf alten Mycelien, insbesondere wenn es sich um Agar-Kulturen handelt, keimen die vorhandenen Konidien nicht wieder aus, auch wenn eine ausreichende Luftfeuchtigkeit vorhanden ist. Auf flüssigen Medien hingegen kann sich auf einem alten Thallus eine neue Mycelgeneration aus den Konidien entwickeln, da die Autolyse des Mycels Glukose freisetzt (LAHOZ, 1971), durch die die Keimung erneut induziert werden kann.

Nicht nur BURGER et al. (1972) haben darauf hingewiesen, daß der Stoffwechsel der Sporen sich von dem des Mycels erheblich unterscheidet. Als Erklärung hierfür kommt eine "spezifische Genaktivierung" (ROTH et al., 1968) in Betracht, wodurch wiederum der Proteinsynthese der entscheidende Ein-

fluß auf die endogene Regulation zugesprochen wird. Aber gerade die Untersuchungen an Keimungsstadien von Pilzsporen haben gezeigt, daß sich für die endogene Regulation der Keimung bis jetzt noch keine allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten aufstellen lassen. YANAGITA (1957, 1963) hat an A s p e r g i l l u s nachweisen können, daß bei der Keimung zunächst eine RNS-Synthese einsetzt und erst dann die Proteinneusynthese, während VAN ETTEN (1968; Van ETTEN et al. 1968, 1969 a und b, 1970) berichtet, daß bei B o t r y o d i p l o d i a die Keimung eher auf translationaler als auf transskriptionaler Ebene induziert und gesteuert wird. Diese Auffassung impliziert das Vorhandensein von m-RNS in der ruhenden Spore. Eine solche m-RNS müßte über lange Zeit stabil sein oder innerhalb der Ruheperiode der Spore durch geringfügige molekulare Veränderungen inaktiv sein. Die Sporenkeimung wäre in diesem Fall von einer Aktivierung einer stabilen m-RNS begleitet. Diese Möglichkeit wird von MANDELSTAMM (1969, zitiert bei SMITH und ANDERSON, 1973) in Erwägung gezogen. Dies kann für B. c i n e r e a zwar nicht ohneweiteres übernommen werden, jedoch ist der hohe RNS-Gehalt der Sporen auffällig. Vor der Keimung liegen kaum nachweisbare Mengen an DNS in der Spore vor, dagegen aber viele freie Aminosäuren und Proteine von hohem Molekulargewicht. Erst nach der Ausbildung des Keimschlauches ändert sich das Proteinmuster der Cytosolproteine. Hieraus sollte geschlossen werden, daß die Proteinsynthese zu einem späten Zeitpunkt der Keimung einsetzt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von SOLL und SONNEBORN (1971 a und b) überein, die festgestellt haben, daß bei B l a s t o c l a d i e l l a der Aminosäurevorrat der Spore bevorzugt zum Aufbau der Proteine während der Keimung benötigt und auch verbraucht wird. Die Änderungen in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Proteine während der Keimung bei B l a s t o c l a d i e l l a ist auch von SILVERMAN (1974) beschrieben worden. In der ruhenden Spore liegen neben der stabilen m-RNS cytoplasmatische Faktoren vor, die den

Übergang vom Ruhe- zum Keimungsstadium bestimmen. Bei B. c i n e r e a handelt es sich um einen puromycinunempfindlichen Faktor, zumal auch beim Zusatz von Puromycin die Sporen keimen. SCHMOYER und LOVETT (1969) haben in ihren Untersuchungen an B l a s t o c l a d i e l l a zeigen können, daß ein ribosomengebundener Faktor in der Spore die Polypeptidkettenverlängerung hemmt (Sporenruhe nach Sporogenese) bzw. wieder zuläßt (Keimung), jenachdem ob er am Ribosom gebunden ist oder nicht. Damit ließe sich auch der Mangel an Polysomen in der Ruhephase erklären, der nicht nur an B l a s t o c l a d i e l l a sondern auch an F u s a r i u m (RADO und COCHRANE, 1971) nachgewiesen worden ist.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit detailliertere Untersuchungen hinsichtlich der Ribosomenstruktur oder der Veränderungen der m-RNS während der Keimung fehlen, weisen die Ergebnisse im Zusammenhang mit den zitierten Arbeiten an anderen Organismen auf ein Charakteristikum der endogenen Regulation der Morphogenese hin: die Spore enthält Faktoren, die erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung benötigt werden. Es sind stabile Faktoren, die durch die Hyphen zum Ort ihrer Funktion transportiert werden und die eine Proteinsynthese auslösen können. Nichts läge näher, als gerade bei einem vielkernigen System anzunehmen, daß ganze Kerne solche Funktionen haben, doch hätte sich dann im Übertragungsversuch eine unterschiedliche Wirkung zwischen kernhaltigem und kernlosem Übertragungsmaterial ergeben, was nicht der Fall war. Gerade für die Keimung, insbesondere aber für die Sporogenese scheint ein komplexerer Regulationsmechanismus vorzuliegen, an dem die Kerne im Sinne einer differentiellen Genaktivierung nur beschränkt beteiligt sind. Hierfür sprechen Beobachtungen, die bei der Überimpfung von Mycelstücken eines Konidienbildners über mehrere Generationen hin gemacht wurden. Solchen Mycelstücken ging allmählich die Fähigkeit zur Konidienbildung verloren, Homogenate angekeimter Konidien

bewirkten bei solchen Kulturen eine Induktion der Konidienbildung. Auch für diesen Prozess scheint nicht unbedingt eine Proteinneusynthse erforderlich zu sein, denn gleichzeitig angebotenes Puromycin verhinderte die Induktion der Konidienbildung nicht. Die Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Regulation der Differenzierung von Faktoren abhängig ist, die unbedingt in der Spore lokalisiert sein müssen. Ihre Bildung scheint kernabhängig zu sein, jedoch müssen sie über einen längeren Zeitraum stabil sein, sodaß es sich eventuell um membrangebundene Faktoren handelt, die sich während der Differenzierung autonom replizieren können. Aus den Übertragungsversuchen, in denen partikelfreies, kernloses Zellhomogenat verwendet wurde, geht hervor, daß diese Faktoren nicht an Mitochondrien oder an die Zellwand gebunden sein können, es sei denn, sie sind reversibel membrangebunden. Sie beeinflussen translationale und posttranslationale Vorgänge, ihre Wirkung ist unabhängig vom Kernbestand der Spore oder des Mycels.

Im Zusammenhang mit der Erörterung über endogene Regulation durch stabile Regulatoren muß die "Zweiphasenwirkung" des Puromycins diskutiert werden. Die erste Phase der Promycinwirkung wird bestimmt durch Veränderungen der Zellstruktur, der Zellwandpermeabilität, durch die Wachstumshemmung, durch die Erhöhung des RNS- und Aminosäuregehalts sowie durch die Störung der Proteinsynthese. Diese Phase ist mit der unmittelbaren Einwirkungszeit identisch. Die zweite Phase ist jene, in der morphologische Veränderungen auftreten, die lediglich im Vergleich zu den Kontrollen auffallen: verfrühte und teilweise induzierte Konidienbildung sowie induzierte Pigmentbildung. Zwischen diesen beiden Phasen lagen mehrere Tage , in denen ein normales Wachstum wieder aufgenommen wurde. Die Versuche mit Puromycin am Wildtypen haben gezeigt, daß das Antibiotikum unwirksam blieb, während verschiedene Homokaryonten bestimmte Veränderungen aufwiesen. Hieraus könnte geschlossen werden, daß

bei hohem Heterokaryosegrad (wie er beim Wildtyp vorliegt) sehr viele verschiedene Arten von t-RNS in der Zelle vorliegen, bedingt durch die Kernabhängigkeit ihrer Synthese. Unter den verschiedenen t-RNS-Arten gibt es solche, die Bindungsstellen für Puromycin haben und andere, denen solche Bindungsmöglichkeiten fehlen. Letztere würden während einer Puromycin-Behandlung funktionsfähig bleiben. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen aber auch im Homokaryonten sowohl puromycinempfindliche als auch unempfindliche t-RNS gebildet zu werden. Die Anzahl der verschiedenen t-RNS-Arten und die Intensität ihrer Synthese scheint im Homokaryonten reduziert zu sein, da Puromycin als Hemmstoff wirksam ist. Während der Keimung wird durch Puromycin das Gleichgewicht innerhalb der Proteinsynthese verschoben. Ein bestimmter Teil an t-RNS muß demnach funktionsunfähig sein. Gleichzeitig reichern sich kleinere Polypeptide, RNS und Aminosäuren an. Ob diese Produkte regulative Funktionen bei der Konidienbildung haben und sogar über einen längeren Zeitraum hin stabil bleiben, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht direkt bewiesen werden. In fast allen Fällen änderte sich aber bei der Induktion der Konidienbildung nach Puromycinbehandlung auch das elektrophoretische Bandenmuster der Cytosolproteine, sodaß eine fehlerhafte Translation als Ursache dieser Induktion nicht auszuschließen ist. Aus allen Ergebnissen, die bei Puromycinversuchen erzielt wurden, kann gefolgert werden, daß neben der fehlerhaften Translation auch Sekundäreffekte der Puromycinbehandlung für die Induktion der Konidienbildung von Bedeutung sind. Unter der Einwirkung des Antibiotikums erhöhte sich z.B. die Zellwandpermeabilität, wodurch ein intensiver Austausch niedermolekularer Stoffe zwischen Medium und Zellen möglich war. Das frische Medium enthielt ausreichend Nährstoffe, die vom Organismus unter diesen Bedingungen schneller aufgenommen wurden als das normalerweise geschieht. Das Medium konnte sich aber auch schneller mit Stoffwechselprodukten anreichern, welche wiederum die Pigmentbildung beein-

flussen, die zu einem so frühen Zeitpunkt der Entwicklung beim unbehandelten Mycel noch nicht auftritt. Der Stoffwechsel befindet sich in dem gleichen Stadium , wie er bei unbehandelten Zellen erst zwei bis drei Tage später vorliegt. Erst die Gesamtheit der durch Puromycin bewirkten Veränderungen am Organismus führt zur Verkürzung des Entwicklungszyklus.

Sowohl die Versuche mit Puromycin als auch die Übertragungsversuche haben verdeutlicht, daß die Konidienbildung durch die Wechselwirkung zwischen einer bestimmten Proteinfraktion und einer nukleotidhaltigen Fraktion die Konidienbildung beeinflußt wird. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von UNO und ISHIKAWA (1973) an C o p r i n u s. Diese Autoren isolierten aus zellfreiem Extrakt von Fruchtkörpern eine fruchtkörperinduzierende Fraktion, die aus Nukleotiden bestand. Die Aktivität dieser Fraktion richtete sich nach der Bindung der Nukleotide an ein spezifisches Protein. Die eigenen Untersuchungen haben ergeben, daß durch solche Faktoren Änderungen im Proteinmuster herbeigeführt werden. Es besteht hierbei auch eine Konzentrationsabhängigkeit: ein zu konzentriertes Angebot der isolierten konidienbildenden Fraktion verursachte eine Wachstumshemmung. Die im Übertragungsversuch zugesetzten Faktoren lösen möglicherweise entweder eine spezifische Kernaktivität aus oder sie sind cytoplasmatisch auf der Ebene der Translation wirksam. Demnach können die Kerne des Empfängerstammes zwar die genetische Information für die Konidienbildung besitzen, jedoch müssen ein oder mehrere Faktoren für die spezifische Genaktivierung fehlen. Kreuzungsversuche mit mehreren konidienfreien Homokaryonten ergaben Mischprodukte, die Konidien bildeten, wenn zellfreier Zellextrakt eines weiteren k o n i d i e n f r e i e n Homokaryonten hinzugefügt wurde (siehe S. 111). Damit sind Hinweise für das Vorhandensein mehrerer Faktoren für die Konidienbildung gegeben.

Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen an C o p r i n u s, wo als FIS [1]) ein spezifischer Faktor isoliert wurde, der als cyclisches AMP charakterisiert werden konnte (UNO und ISHIKAWA, 1973). Die Bedeutung dieses Nukleotids als morphogenetisch aktive Substanz ist in jüngster Zeit an vielen Systemen erkannt worden. Bei Bakterien wird es für die Geißelbildung benötigt (YOKOTA, 1970), es beeinflußt die Proteinsynthese, die GTPase und die RNase bei E s c h e r i c h i a c o l i (KUWANO und SCHLESSINGER, 1970). Cyclisches AMP bewirkt die Zellaggregation bei D i c t y o s t e l i u m (KIRCHEVSKY et al.,1969) und ist inzwischen auch bei Askomyceten und Basidiomyceten gefunden worden (VAN WIJK und KONIJN, 1971; LEONARD und DICK, 1968; URAYAMA, 1969). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß cyclisches AMP bei B. c i n e r e a an der Konidienbildung beteiligt ist, jedoch scheint es keineswegs der a l l e i n i g e Faktor der Sporogenese zu sein. Die Sporogenese ist ebenfalls von einem bestimmten Zustand des Substrates abhängig, der durch den Organismus und dessen Stoffwechsel selbst verändert wird, was auf eine exogene Regulation der Morphogenese hinweist.

4.3. Exogene Regulation der Morphogenese

Die Übertragungsversuche haben deutlich gezeigt, daß B. c i n e r e a bei der Realisierung der Morphogenese auf exogene Faktoren angewiesen ist, deren Vorstufen der Organismus im Verlauf seiner Entwicklung an das Medium abgibt. Diese nimmt er in veränderter Form wieder auf, sobald ein morphogenetischer Prozess eingeleitet werden soll. Ein erhöhtes Angebot an Nährstoffen, eine verbesserte Durchlüftung des Mediums und ein gleichbleibender pH-Wert reichten

---

[1]) FIS = "fruiting-inducing substances"

nicht aus, um Konidien zu bilden. Das konnte an den kontinuierlichen Kulturen gezeigt werden. Das Gegenteil der kontinuierlichen Kultur ist eine statische Agarkultur, bei der der Pilz sowohl seinen Nährstoffbedarf aus dem Kultursubstrat decken kann als auch Stoffwechselprodukte in das Medium abscheiden kann. Diese bleiben am Ort ihrer Abscheidung im Agar und können dort das wachsende Mycel beeinflussen. Es war möglich, den Pilz durch Abdecken des Mediums mit Cellophanfolie am Eindringen in den Nährboden zu hindern, ohne die Abgabe von Stoffwechselprodukten an das Medium zu unterbinden. So konnte nach dem Entfernen der Folie der Einfluß dieser Produkte auf frisch geimpfte Keimmycelien untersucht werden. Wäre das verminderte Nährstoffangebot eines solchen Nährbodens die Ursache für eine verfrühte Konidienbildung, so hätte sie auf Mangelmedien auftreten müssen. Auf solchen Medien verzögerte sich jedoch lediglich die Entwicklung, während einmal bewachsenes Medium bei neubeimpften Konidien eine erstaunliche Verkürzung des Entwicklungszyklus verursachte. Diese Beobachtung war der Anlaß, die Wechselwirkungen zwischen endogenen und exogenen Faktoren mit Hilfe von Übertragungsversuchen zu untersuchen.

Die Faktoren der Pigmentbildung sind im Gegensatz zu denen der Konidienbildung spezifische molekulare Faktoren. Bei der Pigmentbildung konnte zwar eine Wechselwirkung zwischen Substrat und Hyphen charakterisiert werden (Relation zwischen Oxydaseabscheidung und Pigmentbildung), aber eine Induktion durch isolierte Stoffwechselprodukte aus dem Medium oder durch isolierte Fraktionen aus zellfreiem Zellextrakt war nicht möglich. Die Induktion der Pigmentbildung war durch unspezifische physiologische Änderungen der Nährbodenkonzentration möglich und auffälligerweise auch durch den Zusatz von Puromycin. Die dabei auftretende Änderung der Zellwandpermeabilität scheint in enger Beziehung zur induzierten Melaninbildung zu stehen. Voraussetzung für die Pigmentbil-

dung ist das Vorhandensein eines oder mehrerer Enzyme und deren Vorstufen. Sind weder die Enzyme für eine Phenylalaninoxydation noch für eine Tyrosinoxydation vorhanden, weil ein genetischer Fehler vorliegt, so erfolgt auch keine Pigmentbildung. Solche Stämme sind im Strukturgen für das eine oder andere Enzym mutiert. Der Stamm 311 ist ein Beispiel hierfür. Diese Möglichkeit einer Erklärung für das Fehlen von Melaninen bei den Stämmen 261 und 270 wird dann in Frage gestellt, wenn unter dem Einfluß von Puromycin eine Induktion der Pigmentbildung erfolgt. Das bedeutet, daß diesen Stämmen durchaus nicht die Voraussetzungen für eine Synthese des Farbstoffes fehlen, sondern eher die "auslösenden Faktoren". Während bei der Konidienbildung spezifische Faktoren wirksam waren, so konnte die Pigmentbildung allein durch pH-Änderungen im Nährboden oder durch hohe Zuckerkonzentrationen herbeigeführt werden. Die Tyrosinoxydation durch Tyrosinase ist auch in vitro stark pH-abhängig und verläuft nur bei pH 7. Eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Cytoplasma ist aber die erste Folge einer erhöhten Zellwandpermeabilität, wie sie bei Puromycineinwirkung auftritt. Diese pH-Änderung begünstigt die Melaninsynthese. Bei den pigmentfreien Stämmen 261 und 270 liegt nach den vorhandenen Ergebnissen daher lediglich ein Regulationsfehler und kein enzymatischer Defekt vor, da bei einer Änderung der physiologischen Bedingungen eine Merkmalsausbildung erfolgt, die diese Stämme normalerweise über Generationen hin nicht zeigen. Ob es sich bei diesen Stämmen um Suppressormutanten handelt, müßte durch genauere Untersuchungen erst geklärt werden.

In den wenigen Fällen, in denen eine Induzierbarkeit oder eine Intensivierung der Pigmentbildung durch Tyrosin möglich war, muß auf eine Mutation in der Tyrosinsynthese geschlossen werden.

4.4. Wechselwirkungen zwischen endogenen und exogenen Faktoren

In der Abb. 66 sind die wichtigsten Regulationsvorgänge stark vereinfacht zusammengefaßt, die in einem heterokaryotischen System ablaufen. Die genetisch unterschiedlichen Kerne sind mit K_1, K_2 ... bezeichnet. Die Transskription

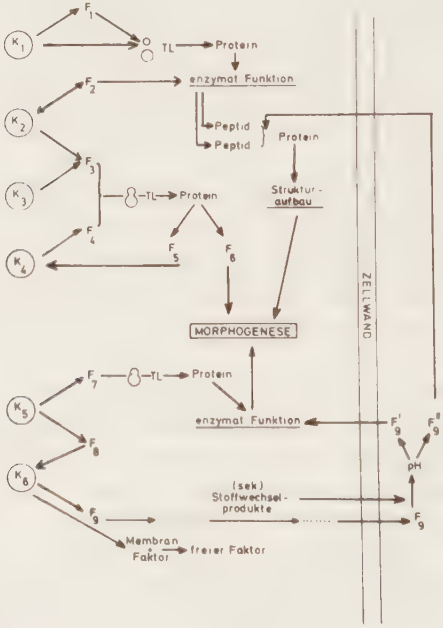


Abbildung: 66 Wechselwirkungen zwischen endogenen und exogenen Faktoren

läuft in jedem Kern autonom ab, wobei Zeitpunkt und Dauer der Transskription vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig ist. Die Frage, ob in einer Zelle mit 80 - 120 Kernen (KOWALSKI, 1971; MENZINGER, 1965) in allen Kernen transskribiert wird, kann nicht beantwortet werden, zumal hierfür experimentelle Ergebnisse fehlen. Bei den Zellen mit so hohem Kerngehalt handelt es sich um Zellen aus der Differenzierungszone oder aus dem subapikalen Bereich. Etwa 60 % der Kerne befinden sich hier in unterschiedlichen Mitosephasen. Sie fallen als aktive t-RNS oder RNS-Lieferanten weg. Diese Kerne strömen z.T. auch in die Spitzenzellen oder in neu gebildete Lufthyphen an den Ort der Konidienbildung. Die übrigen Kerne übernehmen regulative Funktionen. Neben m-RNS und t-RNS liegen aufgrund der Tätigkeit dieser Kerne verschiedene kerndeterminierte Faktoren in der Zelle vor (siehe S.103). Sie sind als solche im Diagramm mit F_1,F_2... bezeichnet. Es möge dahingestellt bleiben, auf welche Weise sie entstehen und ob sie alle eine ähnliche chemische Struktur haben. Ein Kern kann durchaus auch mehrere v e r s c h i e d e n e Faktoren bereitstellen. Solche Faktoren (wie im Beispiel F_1) können die Translation (TL) direkt beeinflussen. Dann handelt es sich um Initiationsfaktoren und ihre Aktivität führt zu einem Protein, das eine enzymatische oder strukturelle Funktion hat. In ähnlicher Weise bewirken solche Faktoren die Ribosomenassoziation und ermöglichen den gleichen Regulationsweg.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß unterschiedliche Kerntypen den g l e i c h e n Faktor synthetisieren können, was wiederum auf eine identische genetische G r u n d -ausstattung aller Kerne hinweist. Manche dieser Faktoren sind jedoch nur dann wirksam, wenn sie mit einem zweiten Faktor verbunden werden, der jedoch von einem anderen Kerntyp als der erste stammt. Nur so läßt sich das Ergebnis einiger Kreuzungen zwischen zwei Homokaryonten deuten (siehe S. 111).

In der Abb. 66 ist die Verbindung von Peptiden durch cytoplasmatische Faktoren angedeutet: erst der Komplex ist funktionsfähig im Sinne einer enzymatischen oder morphologischen Leistung. Das gleiche gilt für die Spaltung von Proteinen durch die Peptide frei werden, denen regulative Funktionen zukommen. In der Abb. 66 ist weiterhin die Möglichkeit dargestellt, daß ein membrangebundener Faktor die Struktur und Funktion eines Produktes beeinflußt. Solche Bindungen an Membranen können reversibel sein.

Die in dieser Arbeit entwickelte Vorstellung von exogener Regulation der Morphognese ist in der Abb. 66 ebenfalls dargestellt: ein vom Kern determinierter Faktor (F_9) verläßt die Zelle, wird dort durch den Einfluß von abgeschiedenen Stoffwechselprodukten oder dem pH-Wert des Mediums verändert und von der Zelle wieder aufgenommen, wo er morphogenetische Vorgänge beeinflussen kann. In der Darstellung ist ein Faktor nicht mitaufgenommen, der an der Zellwand lokalisiert sein müßte, da TAN und EPTON in der Zeit, in der die vorliegende Arbeit zusammengestellt wurde, einen Photorezeptor in der Zellwand von B. c i n e r e a entdeckt haben, der auf die Sporogenese einen erheblichen Einfluß hat (TAN und EPTON, 1974).

Im Zusammenhang mit den Puromycinversuchen ist daraufhingewiesen worden, daß die Zellwandpermeabilitätsänderungen eine Bedeutung für Regulationsvorgänge haben. Hierdurch können zellwandgebundene Faktoren frei und damit wirksam werden oder exogene Faktoren schneller in die Zelle eindringen. Zu diesem Problemkreis existiert von SUTHERLAND (1972) [1]) die Theorie eines "second messengers" auf der Basis seiner Ver-

---

[1]) Sutherland, E.W. (1972)
Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hormone
Angew.Chem. 84, 1117 - 1125

suche zum Wirkungsmechanismus von Adrenalin auf die Stimulierung eines spezifischen Enzyms. Gerade so che Arbeiten weisen auf die äußerst komplexen Vorgänge der Realisierung der Morphogenese hin und versuchen, starre Vorstellungen über den Ablauf morphogenetischer oder auch enzymatischer Prozesse abzubauen und durch Modelle über endogene und exogene Wechselwirkungen zu ersetzen.

Die vorliegende Arbeit hat versucht, hierzu einen Beitrag zu leisten. B. c i n e r e a wurde als System betrachtet, in dem gleiche oder verschiedene Kerne Faktoren bereitstellen, die morphologische Vorgänge beeinflussen. Ganz bewußt ist darauf verzichtet worden, solche Faktoren als "Gene" zu bezeichnen, da die Kernprodukte innerhalb und außerhalb der Zelle erhebliche Veränderungen erfahren, bevor morphogenetische Vorgänge realisiert werden. Als es möglich war, Konidien zu isolieren, die einen oder mehrere Kerne des gleichen Typs enthielten, wurde das System manipulierbar. Mit solchen Konidien konnten aus verschiedenen Homokaryonten gezielt Heterokaryonten rekonstruiert werden. Das ermöglichte die Untersuchung der Beeinflussung von Kernprodukten im Zusammenhang mit morphogenetischen Prozessen. In vitro Versuche oder Untersuchungen mit radioaktiv markierten Stoffen könnten nun gerade an einem solchen System spezifische Probleme der Realisierung der Morphogenese bearbeiten. Hierfür sollten in der vorliegenden Arbeit die Grundlagen geschaffen werden.

5. Zusammenfassung

1. Der Heterokaryosegrad einer Konidie bestimmt die phänotypischen und biochemischen Eigenschaften des daraus entstehenden Mycels und dessen Überdauerungsorgane.

2. Parasexualität ist in keinem der untersuchten Hetrokaryonten festgestellt worden

3. Beim heterokaryotischen Wildtyp liegt eine Kopplung bestimmter Eigenschaften vor:

   a) Konidienbildung und Pigmentbildung
   b) Abscheidung von Oxydasen und Melaninbildung
   c) Konidien- und Sklerotienbildung
   d) Pigmentbildung und rhythmisches Mycelwachstum

4. Die Isolierung von Stämmen mit genetisch, biochemisch und physiologisch unterschiedlichen Eigenschaften, die über mehrere Generationen hin konstant bleiben, ist mit Hilfe einer Auftrennung eines Konidiengemisches nach Kernzahl pro Konidie und anschließender Behandlung mit Temperaturschocks gelungen.

5. Die meisten der isolierten Stämme waren Homokaryonten

6. Bei der Auftrennung der isolierten Kerne aus verschiedenen Homokaryonten im Dichtegradienten konnte eine Hauptfraktion festgestellt werden. Demgegenüber wiesen Heterokaryonten mindestens drei Kernfraktionen auf.

7. Bestimmte Merkmale (insbesondere Pigment- und Konidienbildung), die beim Heterokaryonten normal ausgebildet sind, fanden sich bei den entsprechenden

Homokaryonten verstärkt

8. Die für heterokaryotische Wildtypen charakteristische Induzierbarkeit der Konidienbildung durch Licht und reicheres Nährstoffangebot fehlt bei den konidienfreien Stämmen.

9. Keimung, Konidien- und Sklerotienbildung ließen sich elektrophoretisch durch ein stadienspezifisches Bandenmuster charakterisieren.

10. Die Konzentration stadienspezifischer Proteine nimmt während der Entwicklung zu.

11. Es werden stadienspezifische Substanzen in das Medium abgegeben, die zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung ihrerseits auf die auslösenden Faktoren morphogenetischer Prozesse wirken

12. Diese exogenen Faktoren sind artspezifisch, es handelt sich dabei um eine nukleinsäure-, nukleotid- und ribosehaltige Fraktion

13. Die endogenen Faktoren der Morphogenese sind stammspezifisch, ihre Synthese ist kernabhängig, ihre Wirkung substratabhängig; es handelt sich um eine proteinhaltige Fraktion.

14. Die auslösenden Faktoren der Pigmentbildung werden insbesondere nach Einwirkung von Puromycin wirksam.

15. Zwischen der Abgabe von Oxydasen in das Medium und der Pigmentierung des Mycels besteht eine zeitliche Relation

16. Die Kopplung zwischen Pigmentbildung und Konidienbildung ist beim Wildtyp nur scheinbar vorhanden.

17. Es existieren mehrere Synthesewege für Melanine und mehrere Induktionsfaktoren für diese Synthese nebeneinander.

18. Die Aminosäurekomposition der Plasmaproteine des Wildtyps ist variabel; im Gegensatz hierzu ist die Aminosäurekomposition des Plasmas verschiedener Stämme konstanter.

19. Die Zellwandaminosäurekomposition ändert sich im Verlauf der Entwicklung. Große Unterschiede bestehen zwischen Submers- und Oberflächenmycel sowie zwischen pigmentfreien und pigmentierten Hyphen.

20. Im Zusammenhang mit der Pigmentbildung konnten elektronenoptisch multivesikuläre Körper nachgewiesen werden, die bei pigmentfreien Stämmen entweder ganz fehlten oder nur sehr selten zu finden waren.

6. Literaturverzeichnis

Abu Zinada, A. A. H., A. Cobb u. D. Boulter (1973)
Fine structural studies on the infection of Vicia faba with Botrytis fabae.
Arch. Mikrobiol. 91, 55-66

Ainsworth, G. C. u. A. S. Sussman (1966)
The Fungi (Vol. I-III)
Academic Press, New York

Aitken, W. B. u. D. J. Niederpruem (1970)
Ultrastructural changes and biochemical events in basidiospore germination of Schizophyllum commune.
J. Bacteriol. 104, 981-988

Aksenova, V. A., N. G. Guen u. B. A. Rubin (1971)
On the effect of fungus Botrytis cinerea on the ability of cabbage tissue ribosomes to incorporate labelled amino acids.
Biochimija 36, 538-544

Alberghina, F. A. M., E. Sturani u. L. Schiaffonati (1971)
The peptidyl-puromycin reaction with Neurospoa crassa ribosomes: The number of active ribosomes in different conditions of growth.
Arch. Mikrobiol. 80, 166-175

Altendorf, K. H. u. L. A. Staehelin (1974)
Orientation of membrane vesicles from Escherichia coli as detected by freeze-cleave electron microscopy.
J. Bacteriol. 117, 888-899

Apte, B. N., P. N. Bhavsar u. O. Siddiqui (1974)
The regulation of aryl sulphatase in Aspergillus nidulans.
J. Molec. Biol. 86, 637-648

Aronson, J. M. u. L. Machlis (1959)

The chemical composition of the hyphal walls of the fungus Allomyces.
Amer. J. Bot. 46, 292-300

Aronson, J. M. (1966)

The cell wall.
in: Ainsworth u. Sussman 1966, Bd. I, Kap. 3.

Baldwin, H. H. u. H. P. Rusch (1964)

The chemistry of differentiation in lower organisms.
Ann. Rev. Biochem. 34, 565-594

Baráthová, H., V. Betina u. P. Nemec (1969)

Morphological changes induced in fungi by antibiotics.
Folia microbiologica 14, 475-483

Bartnicki-Garcia, S. (1966)

Chemistry of hyphal walls of Phytophtora.
J. Gen. Microbiol. 42, 57-69

Bartnicki-Garcia, S. (1968)

Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi.
Ann. Rev. Microbiol. 22, 87-107

Bartnicki-Garcia, S. (1969)

Cell wall differentiation in the Phycomycetes.
Phytopathology 59, 1065-1071

Bartnicki-Garcia, S. (1973)

Fundamental aspects of hyphal morphogenesis.
in: Microbiol Differentiation, J. M. Ashworth u. G. E. Smith, eds.; 23. Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press

Bartnicki-Garcia, S. u. E. Lippmann (1969)

Fungal morphogenesis; Cell wall construction of Mucor rouxii.
Science 165, 302-304

Bartnicki-Garcia, S., N. Nelson u. E. Cota-Robles (1968)

Electron microscopy of spore germination and cell wall formation in Mucor rouxii.
Arch. Mikrobiol. 63, 242-255

Bartnicki-Garcia, S. u. W. J. Nickerson (1962)

Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii.
Biochem. Biophys. Acta 58, 102-119

Beadle, G. W. u. V. L. Coonradt (1944)

Heterokaryosis in Neurospora crassa.
Genetics 29, 291-308

Beth, K. (1943a)

Ein- und zweikernige Transplantate zwischen Acetabularia mediterranea und Acetabularia schenckii.
Ztg. Abstamm. u. Vererbungslehre 81, 271-312

Beth, K. (1943b)

Ein- und zweikernige Transplantate verschiedener Acetabulariaceen.
Naturwissenschaften 31, 206-207

Beth, K. (1953)

Über den Einfluß des Kernes auf die Formbildung von Acetabularia in verschiedenen Entwicklungsstadien.
Z. Naturforsch. 8b, 771-775

Beth, K. (1955a)

Beziehungen zwischen Wachstum und Formbildung in Abhängigkeit von Licht und Temperatur bei Acetabularia.
Z. Naturforsch. 10b, 267-276

Beth, K. (1955b)

Unterschiedliche Beeinflussung von Wachstum und Teilung durch Veränderung von Licht und Temperatur.
Z. Naturforsch. 10b, 276-281

Bienengräber, V., H. Friemel, J. Brock, H. Kleist u. D. Mücke (1968)

Proteine aus Neurospora crassa
3. Agargel- und immunelektrophoretische Analyse von Enzymen und Isoenzymen bei verschiedenen Stämmen von Neurospora crassa.
Eur. J. Biochem. 6, 356-372

Blaich, R. (1966)

Eine enzymatische Methode zum quantitativen Tyrosinnachweis.
Z. Naturforsch. 21b, 81

Bland, C. E. u. T. M. Charles (1972)

Fine structure of Pilobolus: surface and cell wall structure.
Mycologia 64, 774-785

Boulter, D. (1957)

The oxidases of Gelasinospora tetrasperma in relation to the endogenous respiration.
J. Gen. Microbiol. 16, 305-316

Brachet, J. (1958)

New observations on biochemical interactions between nucleus and cytoplasm in Amoeba and Acetabularia.
Exptl. Cell Res. Suppl. 6, 78-96

Brachet, J. (1961)

Nucleocytoplasmic interactions in unicellular organisms.
in: The Cell, J. Brachet u. A. E. Mirsky, eds.
Academic Press, New York, Amsterdam, London

Brachet, J. (1967)

Protein synthesis in the absence of the nucleus.
Nature 213, 650-655

Brachet, J., H. Chantrenne u. F. Vanderhaeghe (1955)

Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires II. Acetabularia mediterranea.
Biochem. Biophys. Acta 18, 544-563

Brown, D. D. u. E. Littna (1964)

Variations in the synthesis of stable RNA's during oogenesis and development of Xenopus laevis.
J. Molec. Biol. 18, 688-695

Brown, W. (1923)

Experiments on the growth of fungi on culture media.
Ann. Botany 37, 105-129

Brown, W. C. u. F. E. Young (1967)

Dynamic interactions between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 564-568

Buller, A. M. R. (1941)

Researches on fungi.
Bot. Rev. 7, 335-431

Burger, A., A. Prinzing u. H. J. Riesener (1972)

Untersuchungen über den Glucosestoffwechsel keimender Uredosporen von Puccinia graminis var. tritici.
Arch. Mikrobiol. 83, 1-16

Burnett, J. H. (1968)

Fundamentals of Mycology.
San Martin's Press, New York

Buttler, G. (1972)

Nuclear and non nuclear factors influencing clamp connection formation in Coprinus disseminatus.
Ann. Bot. 36, 263-279

Buxton, E. W. (1954)

Heterokaryosis and variability in Fusarium oxysporum.
J. Gen. Microbiol. 10, 71-84

Buxton, E. W. (1956)

Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of Fusarium oxysporum.
J. Gen. Microbiol. 15, 133-139

Calponzos, L. (1954)

Controlled sporulation of Cercospora musae in pure culture.
Nature 173, 1084

Campbell, C. K. (1971)

Fine structure and physiology of conidial germination in Aspergillus fumigatus.
Transactions Brit. Mycolog. Soc. 57, 393-402

Cantino, E. C. (1966)

Morphogenesis in aquatic fungi.
in: Ainsworth u. Sussman, 1966, Bd. II, Kap. 10

Cantino, E. C. u. J. S. Lovett (1964)

Non filamentous aquatic fungi: Model systems for biochemical studies of morphological differentiation.
Advan. Morphol. 3, 33-93

Carter, B. L. A. u. H. O. Halvorson (1973)

Periodic changes in rate of amino acid uptake during yeast cell cycle.
J. Cell Biology 58, 401-409

Chung, P. L. u. J. R. Trevithick (1970)

Biochemical and histochemical localization of invertase in Neurospora during conidial germination and hyphal growth.
J. Bacteriol. 102, 423-429

Clauss, H. (1963)

Über den Einfluß von Rot- und Blaulicht auf das Wachstum kernhaltiger Teile von Acetabularia mediterranea.
Z. Naturforsch. 50b, 719

Clauss, H. (1968)

Beeinflussung der Morphogenese, Substanzproduktion und Proteinzunahme von Acetabularia mediterranea durch sichtbare Strahlung.
Protoplasma 65, 49-80

Clauss, H. u. G. Werz (1961)

Über die Geschwindigkeit der Proteinsynthese in kernlosen und kernhaltigen Zellen von Acetabularia.
Z. Naturforsch. 16b, 161-165

Clegg, G. S. u. M. F. Filosa (1965)

Trehalose in the cellular slime mold Dictyostelium mucoroides.
Nature 192, 1077-1078

Clutterbuck, A. J. u. J. A. Raper (1966)

A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of Aspergillus nidulans.
Genet. Res. Camb. 7, 185-194

Cove, D. G. (1974)

Evolutionary significance of autogenous regulation.
Nature 251, 256

Cove, D. G. u. J. A. Pateman (1969)

Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in Aspergillus nidulans.
J. Bacteriol. 97, 1374-1378

Crandall, M. A. u. T. D. Brock (1968)

Molecular basis of mating in the yeast Hansenula wingii.
Bacteriol. Rev. 32, 139-163

Crocken, B. J. u. J. F. Nye (1964)

Phospholipid variations in mutant strains of Neurospora crassa.
J. Biol. Chem. 239, 1727-1730

Davies, R. H. (1966)

Heterokaryosis
in: Ainsworth u. Sussman, 1966; Bd. II, pp.567-588

Davies, R. H. (1967)

Channeling in Neurospora metabolism.
in: Organizational Biosynthesis, H. J. Vogel, J. O. Lampen u. V. Bryson, eds.; Academic Press, New York

Davies, D. R. (1972)

Cell wall organization in Chlamydomonas reinhardii. The role of extra-nuclear systems.
Molec. Gen. Genet. 115, 334- 348

Day, R. P. (1960)

Variation in phytopatogenic fungi.
Ann. Rev. Microbiol. 14, 1-16

Diakemakos, E. G., L. Garnjobst u. E. L. Tatum (1965)

A cytoplasmic character in Neurospora crassa; The role of nuclei and mitochondria.
J. Cell Biol. 26, 427-443

Douglas, R. J. u. C. L. San Clemente (1956)

Respiration of scab-producing strains of Actinomycetes.
Can. J. Microbiol. 2, 407-415

Duffus, J. H. (1969)

The isolation of nuclei from the yeast Schizosaccharomyces pombe.
Biochem. Biophys. Acta 195, 230-233

Emeis, C. C. u. S. Windisch (1960)

Prüfung der Kernwertigkeit polyploider Hefen mit der Massenisolierungstechnik.
Naturwiss. 47, 210-211

van Etten, J. L. (1968a)

Protein synthesis during fungal spore germination. I. Characteristics of an in vitro phenylalanine-incorporating system prepared from germinated spores of Botryodiplodia theobromae.
Arch. Biochem. Biophys. 121, 13-21

van Etten, J. L. (1968b)

II. Aminoacyl-soluble RNA-synthetase activities during germination of Botryodiplodia theobromae.
J. Bacteriol. 96, 1042-1048

van Etten, J. L. u. R. M. Brambl (1969a)

III. Transfer activity during germination of Botryodiplodia theobromae spores.
Phytopathology 59, 1894-1902

van Etten, J. L., K. Koski u. M. El Olemy (1969b)

IV. Transfer RNA from germinated and ungerminated spores.
J. Bacteriol. 100, 1182-1186

van Etten, J. L. u. R. M. Brambl (1970)

V. Evidence that the ungerminated conidiospores of Botryodiplodia theobromae contain mRNA.
Arch. Biochem. Biophys. 137, 442-452

Faro, S. (1972)

Physiological aspects of pigment production in relation to morphogenesis in Panus tigrinus.
Mycologia 64, 375-387

Fay, P. (1969)

Cell differentiation and pigment composition in Anabaena cylindrica.
Arch. Mikrobiol. 67, 62-70

Fincham, J. R. S. (1960)

Genetically controlled differences in enzyme activity.
Advances in Enzymology 22, 1

Fletcher, J. (1973)

The distribution of cytoplasmic vesicles, multivesicular bodies, and paramural bodies in elongating sporangiophores and swelling sporangia of Thamnidium elegans.
Ann. Bot. 37, 955-[illegible]

Fling, M., N. H. Horowitz u. S. F. Heinz ann [illegible]

The isolation and properties of crystalline tyrosinase from Neurospora.
J. Biol. Chem. 221, 2045-2053

Fouquet, H. (1974)

Differential RNA synthesis in the mitotic cycle of Physarum polycephalum.
FEBS Letters 38, 184-186

Franke, R. G. u. J. A. Berry (1972)

Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some Myxomycetes, Order Physarales.
Mycologia 64, 830-353

Fries, N. (1943)

Die Einwirkung von Adermin, Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Ascomyceten.
Symbolae Botan. Upsaliensis 7, 1-73

Fries, N. (1966)

The chemical environment for fungal grwoth.
in: Ainsworth u. Sussman, 1966, Bd. I, Kap. 19

Fultz, S. A. u. R. A. Wolf (1972)

Surface structure in Allomyces during germination and growth.
Mycologia 64, 212-218

Gairola, G. u. D. Powell (1971)

Elektrophoretische Proteinmuster von Cytospora.
Phytopath. Z. 71, 135-140

Garnjobst, L. (1953)

Genetic control of heterocaryosis in Neurospora crassa.
Am. J. Bot. 40, 607-614

Garnjobst, L. (1955)

Further analysis of genetic control of heterocaryosis in Neurospora crassa.
Am. J. Bot. 42, 444-448

Giardina, G. (1954)

Role of the nucleus in the maintenance of the protein level in the alga Acetabularia mediterranea.
Experimentia 10, 215

Gibardt, M. (1973)

Morphologie und Morphogenese von Pilzzellen.
Fortschr. d. Bot. 35, 23-36

Glaser, L. u. D. H. Brown (1957)

The synthesis of chitin in cellfree extracts of Neurospora crassa.
J. Biol. Chem. 228, 729-742

Glynn, A. N. u. J. Reid (1969)

Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus Fusarium.
Can. J. Bot. 47, 1923-1831

Gottlieb, D. u. P. G. Caltrider (1966)

Sysnthesis of enzymes during the germination of fungus spores.
Nature 197, 916-917

Graafmans, W. D. J. (1973)

The influence of carbon dioxide on morphogenesis in Penicillium isariiforme.
Arch. Mikrobiol. 91, 67-76

Grigg, G. W. (1960)

The control of conidial differentiation in Neurospora.
J. Gen. Microbiol. 22, 662-666

Grindle, M. u. R. H. Davies (1970)

Variations in enzyme phenotypes and their underlying genotypes among wild strains of the genus Neurospora.
Genet. Res. Camb. 15, 99

Grove, S. N. u. C. E. Bracker (1970)

Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper.
J. Bacteriol. 104, 988-1009

Groves, J. W. u. F. L. Drayton (1939)

The perfect stage of Botrytis cinerea.
Mycologia 31, 485-489

Gull, K. u. A. P. J. Trinci (1971)

Fine structure of spore germination in Botrytis cinerea.
J. Gen. Microbiol. 68, 207-220

Hames, B. D. u. J. M. Ashworth (1974)

The metabolism of macromolecules during the differentiation of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum containing different amounts of glycogen.
Biochem. J. 142, 301-315

Hämmerling, J. (1931)

Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea.
Biol. Zbl. 51, 633-647

Hämmerling, J. (1932)

Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia.
II. Das Formbildungsvermögen von kernhaltigen und kernlosen Teilstücken.
Biol. Zbl. 52, 42-61

Hämmerling, J. (1934a)

Regenerationsversuche an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen von Acetabularia wettsteinii.
Biol. Zbl. 54, 600-665

Hämmerling, J. (1934b)

Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft.
Arch. Entwicklungsmechan. 131, 1-81

Hämmerling, J. (1940)

Transplantationsversuche zwischen Acetabularia mediterranea und Acetabularia crenulata.
Note Ist. Biol. mar. Rovigno 2, 1

Hämmerling, J. (1943a)

Entwicklung und Regeneration von Acetabularia crenulata.
Z. Abstamm. u. Vererbungslehre 81, 84-113

Hämmerling, J. (1943b)

Ein- und zweikernige Transplantate zwischen Acetabularia mediterranea und Acetabularia crenulata.
Z. Abstamm. u. Vererbungslehre 81, 114-180

Hämmerling, J. (1946a)

Neue Untersuchungen über die physiologischen und genetischen Grundlagen zur Formbildung.
Naturwiss. 11, 361-365

Hämmerling, J. (1946b)

Dreikernige Transplantate zwischen Acetabularia crenulata und mediterranea.
Z. Naturforsch. 1, 337-342

Hämmerling, J. (1955)

Über mehrkernige Acetabularien und ihre Entstehung.
Biol. Zbl. 74, 420-427

Hämmerling, J. (1958)

Über die wechselseitige Abhängigkeit von Zelle und Kern.
Z. Naturforsch. 13b, 440-448

Hämmerling, J. (1963a)

Nucleocytoplasmic interactions in Acetabularia and other cells.
Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 65-92

Hämmerling, J. (1963b)

The role of the nucleus in differentiation in Acetabularia.
Symposia Soc. Exptl. Biol. 17, 127-137

Hämmerling, J., H. Clauss, K. Keck, G. Richter u. G. Werz (1958)

Growth and protein synthesis in nucleated and anucleated cells.
Exptl. Cell Res. Suppl. 6, 210-226

Hansen, H. N. u. R. E. Smith (1932)

The mechanism of variation in imperfect fungi: Botrytis cinerea.
Phytopathol. 22, 953-964

Haskins, R. H., A. P. Tulloch u. R. G. Micetich (1964)

Steroids and stimulation of sexual reproduction of a species of Pythium.
Can. J. Microbiol. 10, 187-195

Hawker, L. E. (1950)

Physiology of Fungi
University of London Press, London

Hawker, L. E. (1965)

The fine structure of fungi as revealed by electron microscopy.
Biol. Rev. 40, 52-92

Hawker, L. E. (1966)

Environmental influence on reproduction.
in: Ainsworth u. Sussman, 1966, Bd. II, Kap. 14

Heath, J. B., J. L. Gay u. A. D. Greenwood (1971)

Cell wall formation in the Saprolegniales: cytoplasmic vesicles underlying developing walls.
J. Gen. Microbiol. 65, 225-232

Heisenberg, M. u. E. Cerdá-Olmedo (1968)

Segregation of heterokaryons in the asexual cycle of Phycomyces.
Molec. Gen. Genet. 102, 187-195

Hoffmann, G. M. (1963)

Untersuchungen über die Kernverhältnisse bei Fusarium oxysporum.
Arch. Mikrobiol. 49, 51-63

Horikoshi, K. u. Y. Ikeda (1968)

Studies on the conidia of Aspergillus oryzae. VII. Development of protein synthesizing activity during germination.
Biochim. Biophys. Acta 166, 505-511

Horowitz, N. H., M. Fling, H. L. Macleod u. N. Sucoka (1960)
Genetic determination and enzymatic induction of tyrosinase in Neurospora.
J. Mol. Biol. 2, 96-104

Horowitz, N. H. u. S. C. Shen (1952)
Neurospora tyrosinase.
J. Biol. Chem. 197, 513-520

Huebschman, C. A. (1952)
A method for varying the average number of nuclei in the conidia of Neurospora crassa.
Mycologia 44, 599-604

Hutchinson, J. M., K. D. McDonald u. M. Gillett (1963)
Heterokaryon studies and the genetic control of penicillin and chrysogenin production in Penicillium chrysogenum.
J. Gen. Microbiol. 33, 375-383

Inesi, G., M. Millman u. S. Eleter (1973)
Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes.
J. Mol. Biol. 81, 483-504

Jaffe, L. u. H. Etzold (1962)
Orientation and locus of tropic photoreceptor molecules in spores of Botryris and Osmunda.
J. Cell Biol. 13, 13-31

Jantzen, H. (1973)
Änderungen des Genaktivitätsmusters während der Entwicklung von Acanthamoeba castellanii.
Arch. Mikrobiol. 91, 163-178

Jinks, L. (1954)
Somatic selection in fungi.
Nature 174, 409-410

Kadowaki, K. u. H. O. Halvorson (1971)

Appearance of a new species of ribonucleic acid during sporulation in Saccharomyces cerevisiae.
J. Bacteriol. 105, 826-830

Keck, K. u. H. Clauss (1958)

Nuclear control of enzyme synthesis in Acetabularia.
Bot. Gaz. 120, 43-49

Killick, K. A. u. B. E. Wright (1974)

Regulation of enzyme activity during differentiation in Dictyostelium discoideum.
Ann. Rev. Microbiol. 28, 139-166

Kirchevsky, M. I., L. L. Love u. B. M. Chassy (1969)

Acceleration of morphogenesis in Dictyostelium discoideum by exogeneous mononucleotides.
J. Gen. Microbiol. 57, 383-389

Kirchevsky, M. I. u. B. E. Wright (1963)

Environmental control of the course of development in Dictyostelium discoideum.
J. Gen. Microbiol. 32, 195-207

Kornberg, A., J. A. Spudich, D. R. Nelson u. M. P. Deutscher (1958)

Origin of proteins in sporulation.
Ann. Rev. Biochem. 37, 51

Korth, H. u. G. Pulverer (1971)

Pigment formation for differentiating.
Appl. Microbiol. 21, 541

Kovacs, A. u. E. Szeðke (1956)

Die phytopathologische Bedeutung der kutikulären Exkretion.
Phytopath. Z. 27, 335-349

Kowalski, W. (1971)

Karyologische Untersuchungen an Botrytis cinerea.
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

Krassilnikov, N. A., O. S. Terekhov u. G. M. Zenova (1971)
The effect of tyrosine stereoisomers on the production of melanin-like pigments by Ascomycetes.
Mikrobiologija (Mosk.) 40, 481-484

Kuo, M. G. u. M. Alexander (1967)
Inhibition of the lysis of fungi by melanins.
J. Bacteriol. 94, 624-629

Kushner, D. J. (1969)
Self assembly of biological structures.
Bacteriol. Rev. 33, 302-345

Kuwano, M. u. D. Schlessinger (1970)
Binding of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate to G factor of Escherichia coli, and its effects on GTPase, RNase V, and protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 146-152

Lahoz, R. (1971)
Chemical and physiological changes in filamentous fungi during autolysis.
X. Changes in the concentration of polyol in autolyzing cultures of several fungi.
Mycopath. Mycol. appl. 43, 223-228

Lambert, E. B. (1933)
Effect of excess carbon dioxide on growing mushrooms.
J. Agr. Res. 47, 599-608

Lazaroff, N. (1973)
Photomorphogenesis and Nostocean development
in: The Biology of Blue-Green Algae, N. G. Carr u. B. A. Whitton, eds.; Blackwell Publ. Co., Oxford

Leach, Ch. (1972)
An action spectrum for light-induced sexual reproduction in the ascomycete fungus Leptosphaerulina trifolii.
Mycologia 64, 475-489

Leal, J. A., J. Friend u. P. Holliday (1964)
A factor controlling sexual reproduction in Phytophtora.
Nature 203, 545-546

Leonard, T. J. u. S. Dick (1968)
Chemical induction of haploid fruiting bodies in Schizophyllum commune.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 745-751

Leonian, L. H. u. V. G. Lilly (1940)
Studies on the nutrition of fungi:
Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi.
Am. J. Bot. 27, 18-26

Lerner, A. B. (1953)
Metabolism of phenylalanin and tyrosine.
Adv. in Enzymology 14, 73-128

Lilly, V. G. (1966)
Chemical constituents of the fungal cell.
in: Ainsworth u. Sussman 1966, Bd. II, Kap. 8

Lilly, V. G. u. H. L. Barnett (1949)
The influence of concentration of nutrients thiamin and biotin upon growth, and the formation of perithecia and ascospores by Chaetomium convolutum.
Mycologia 41, 186-196

Lilly, V. G. u. H. L. Barnett (1951)
Physiology of the fungi.
McGraw Hill Publ. Co., New York

Lockhardt, C. L. (1969)
Influence of various factors on repeated sporulation of sclerotia of Botrytis convoluta.
Proc. Can. Phytopathol. Soc. 36, 16

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. G. Randall (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Lowry, R. J. u. A. S. Sussman (1968)

Ultrastructural changes during germination of ascospores of Neurospora tetrasperma.
J. Gen. Microbiol. 51, 403-409

Lysek, G. (1974)

Zonierungen und Hexenringe:
Morphologische Differenzierungen bei Pilzen.
Naturw. Rdsch. 27, 449-455

Lysek, G. u. K. Esser (1971)

Rhythmic mycelial growth in Podospora anserina:
II. Evidence for a correlation with carbohydrate metabolism.
Arch. Mikrobiol. 75, 360-373

Maas, J. L. (1972)

Growth and sporulation of Botrytis convulata with various carbon and nitrogen sources.
Mycologia 64, 897-903

McClure, W. K., D. Park u. P. M. Robinson (1968)

Apical organization in the somatic hyphae of fungi.
J. Gen. Microbiol. 50, 177-182

McCoy, E., A. E. Girard u. J. M. Kornfield (1971)

Fine structure of resting and germinating Penicillium chrysogenum conidiospores.
Protoplasma 73, 443-456

Machlis, L. (1966)

Sex Hormones in Fungi.
in: Ainsworth u. Sussman 1966, Bd. II, Kap. 13

Magee, P. T. u. A. K. Hopper (1974)

Protein synthesis in relation to sporulation and meiosis in yeast.
J. Bacteriol. 119, 952-960

Mahadevan, P. R. u. E. L. Tatum (1965)

Relationship of the major constituents of the Neurospora crassa cell wall to wild type and colonial morphology.
J. Bacteriol. 90, 1073-1081

Mahadevan, P. R. u. U. R. Mahadkar (1970)

Roles of enzymes in growth and morphology of Neurospora crassa:
Cell wall bound enzymes and their possible role in branching.
J. Bacteriol. 101, 941-947

Mandels, G. R. (1963)

Endogenous respiration of fungus spores in relation to dormancy and germination.
Annals New York Acad. Sci. 102, 724-739

Mandelstamm, J. (1969)

Regulation of bacterial spore formation in microbial growth.
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 377-402

Marchant, R. u. A. W. Robards (1968)

Membrane systems associated with the plasmalemma of plant cells.
Ann. Bot. 32, 457-471

Maschlanka, H. (1943)

Zweikernige Transplantate zwischen Acetabularia crenulata und Acicularia Schenckii.
Naturwissenschaften 31, 549

Maschlanka, H. (1946)

Kernwirkung in artgleichen und artverschiedenen Acetabularia Transplantaten.
Biol. Zbl. 65, 167

Massey, L. K. u. J. B. Clark (1973)

Changes in RNA transcription during morphogenesis of Arthrobacter crystallopoietes.
J. Gen. Microbiol. 77, 51-60

von Massow, F. u. F. Schmid (1973)

Untersuchungen an Farbstoff-produzierenden Holzpilzen
II. Über das Auftreten eines Enzyms vom Laccase Typ während der Bildung von Terphenylchinon Farbstoffe.
Arch. Mikrobiol. 92, 353-357

von Massow, F. u. M. Tevini (1973)

Untersuchungen an Farbstoff-produzierenden Holzpilzen
III. Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Lipide bei Peniophora sanguinea durch Tyrosingabe.
Arch. Mikrobiol. 94, 89-92

Mather, K. (1961)

Nuclear materials and nuclear change in differentiation.
Nature 190, 404-406

Matthews, T. R. u. D. J. Niederpruem (1972)

Differentiation in Coprinus lagopus
I. Control of fruiting and cytology of initial events.
Arch. Mikrobiol. 87, 257-268

Maurer, R. (1968)

Disk Elektrophorese.
Walter de Gruyter u. Co., Berlin

Menzinger, W. (1965)

Karyologische Untersuchungen an Arten und Formen der Gattung Botrytis.
Arch. Mikrobiol. 52, 178-196

Meyer, J. A. u. J. L. Renard (1969)

Protein and esterase patterns of two formae speciales of Fusarium oxysporum.
Phytopath. 59, 1409-1411

Miller, P. M. (1955)

V8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria.
Phytopathol. 45, 461-462

Mills, G. L. (1973)

Factors influencing the germination of basidiospores of Coprinus radiatus.
J. Gen. Microbiol. 77, 393-401

Mishra, N. C. (1971)

Heterokaryosis by Neurospora sitophila.
Genetics 67, 55-59

Mitchell, R. u. N. Sabar (1966)

Autolytic enzymes in fungal cell walls.
J. Gen. Microbiol. 42, 39-42

Mizukami, Y. u. M. Iwasuchi (1970)

Effects of actinomycin D and cycloheximide on morphogenesis and synthesis of RNA and protein in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum.
Exptl. Cell Res. 63, 317-324

Moore, S. u. W. H. Stein (1948)

in: Methods of Enzymology, S. P. Colowick u. N. O. Kaplan, eds., Bd. III, S. 468
Academic Press, New York

Moore-Landecker, E. u. G. Stotzky (1972)

Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria.
Can. J. Microbiol. 18, 957-962

Moore-Landecker, E. u. G. Stotzky (1973)

Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites.
Mycologia 65, 519-530

Müller, J. u. H. Melchinger (1964)

Methoden der Mikrobiologie
Kosmos Gesellschaft der Naturfreunde, Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart

Neidhardt, F. C. (1966)

Roles of amino acid activating enzymes in cellular physiology.
Bacteriol. Rev. 30, 701-719

Nickerson, W. (1954)

Experimental control of morphogenesis in micro-organisms.
Annals New York Acad. Sci. 60, 50-57

Nicolaus, R. A., M. Piatelli u. E. Fattorusso (1964)

The structure of melanins and melanogenesis
IV. On some natural melanins.
Tetrahedron 20, 1163-1172

Niederpruem, D. J. (1963)

Role of carbon dioxide in the control of fruiting of Schizophyllum commune.
J. Bacteriol. 85, 1300-1308

Niederpruem, D. J., H. Hobbs u. L. Henry (1964)

Nutritional studies of development in Schizophyllum commune.
J. Bacteriol. 88, 1721-1729

Niederpruem, D. J. u. J. G. H. Wessels (1969)

Cytodifferentiation and morphogenesis in Schizophyllum commune.
Bacteriol. Rev. 33, 505-535

Nishi, A. (1961)

Role of phosphate and phospholipid in germinating spores of Aspergillus niger.
J. Bacteriol. 81, 10-19

Northcote, D. H. (1952)

The cell walls of higher plants: their composition, structure and growth.
Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 33, 53-102

Ornstein, L. (1964)

Disc electrophoresis: Background and theory.
Annals New York Acad. Sci. 121, 321-349

Osumi, M., N. Miwa, Y. Teranishi, A. Tanaka u. S. Fukui (1974)

Ultrastructure of Candida yeasts grown on n-alkanes
Appearance of microbodies and its relationship to high catalase activity.
Arch. Microbiol. 99, 181-201

Park, D. u. P. M. Robinson (1966a)

Internal pressure of hyphae tips of fungi and its significance in morphogenesis.
Ann. Bot. 30, 425-439

Park, D. u. P. M. Robinson (1966b)

Aspects of hyphal morphogenesis in fungi.
in: Trends in Plant Morphogenesis, E. G. Cutler, ed., Longmans, Green u. Co., Ltd.,

Pitt, D. (1969)

Cytochemical evidence for the existence of peroxysomes in Botrytis cinerea.
J. Histochem. Cytochem. 17, 613-616

Pittenger, T. H. (1964)

Spontaneous alterations of heterokaryon incompatibility factors in Neurospora.
Genetics 50, 471-484

Pittenger, T. H. u. T. G. Brawner (1961)

Genetic control of nuclear selection in Neurospora heterokaryons.
Genetics 46, 1645-1663

Posner, H. (1970)

Inhibitory effect of carbohydrate on flowering in Lemna perpusilla
II. Reversal by glycine on l-aspartate: correlation with reduced levels of ß-carotine and chlorophyll.
Plant Physiol. 45, 687-690

Rado, A. u. W. Cochrane (1971)

Ribosomal structure and spore germination in Fusarium solani.
J. Bacteriol. 106, 301-304

Raper, J. R. (1952)

Auslösende Faktoren der Fruchtkörperbildung.
Bot. Rev. 18, 447-545

Raper, J. R. u. J. P. San Antonio (1954)

Heterokaryotic mutagenesis in Hymenomycetes I. Heterokaryosis in Schizophyllum commune.
Am. J. Bot. 41, 69-86

Reavill, M. J. (1954)

Effect of certain chloronitrobenzenes on germination, growth, and sporulation of some fungi.
Annals Appl. Biol. 44, 448-460

Reissing, J. L. u. J. E. Glasgow (1971)

Mucopolysaccharide which regulates growth in Neurospora.
J. Bacteriol. 106, 882-889

Richmond, D. V. u. R. J. Pring (1971)

Fine structure of germinating Botrytis fabae conidia.
Ann. Bot. 35, 495-500

Richter, G. (1962)

Die Wirkung von blauer und roter Strahlung auf die Morphogenese von Acetabularia.
Naturwissenschaften 49, 238

Riedel, V. u. G. Gerisch (1971)

Regulation of extracellular cyclic AMP phosphodiesterase activities during development of Dictyostelium discoideum.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 119-124

Riedel, V., G. Gerisch, E. Müller u. H. Beng (1973)

Defective cyclic AMP-phosphodiesterase Regulation in morphogenetic mutants of Dictyostelium discoideum.
J. Molec. Biol. 74, 573-585

Rippel, A. u. G. Behr (1930)

Über die Verteilung des Magnesiums im Pilzmycel.
Arch. Mikrobiol. 1, 271-276

Rippel, K. (1933)

Untersuchungen über die Abhängigkeit der Sporenkeimung vom Wassergehalt der Luft bei Cladosporium fulvum und anderen Pilzen.
Arch. Mikrobiol. 4, 530-542

Röhrscheidt, E. u. J. Tarnok (1972)

Untersuchungen an Nocardia Pigmenten
Chromatographische Eigenschaften der Farbstoffe und ihre Bedeutung für die Differenzierung pigmentfreier Nocardia Stämme.
Zbl. Bakteriol. Prasitenkde. 221, 221-233

Roth, R., J. M. Ashworth u. M. Sussman (1968)

Periods of genetic transcription required for the synthesis of three enzymes during cellular slime mold development.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 1235-1242

Roth, R. u. M. Sussamn (1968)

Trehalose-6-phosphate synthetase and its regulation during slime mold development.
J. Biol. Chem. 243, 5081-5087

Rudolph, H. u. B. Furch (1970)

Untersuchungen zur Aktivierung von Sporenhomogenaten durch Wärmebehandlung
VII. Beitrag zur Kausalanalyse der Wärmeaktivierung der Sporen von Phycomyces blakeslecanus.
Arch. Mikrobiol. 72, 175-181

Sauer, H. W., K. L. Babcock u. H. P. Rusch (1969)
Changes in RNA synthesis associated with differentiation (sporulation) in Physarum polycephalum.
Biochim. Biophys. Acta 195, 410-421

Schmoyer, J. R. u. J. S. Lovett (1969)
Regulation of protein synthesis in zoospores of Blastocladiella.
J. Bacteriol. 100, 854-864

Schweiger, H. G. u. H. J. Bremer (1960)
Nachweis cytoplasmatischer Ribonucleinsäuresynthese in kernlosen Acetabularien.
Exptl. Cell Res. 20, 617-618

Schweiger, H. G., G. Werz u. W. Reuter (1969)
Tochter-generationen von heterologen Implantaten bei Acetabularia.
Protoplasma 68, 354-356

Scribner, H. E., T. Tang u. S. G. Bradley (1973)
Production of a sporulation pigment by Streptomyces venezuelae.
Appl. Microbiol. 25, 873-879

Silverman, P. M., M. M.-O. Huh u. L. Sun (1974)
Protein synthesis during zoospore germination in the aquatic Phycomycete Blastocladiella emersonii.
Develop. Biol. 40, 59-70

Smith, J. E. u. J. G. Anderson (1973)
Differentiation in the Aspergilli.
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 23, 295-337

Soll, D. R. u. D. R. Sonneborn (1971a)
Zoospore germination in Blastocladiella emersonii: Cell differentiation without protein synthesis?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 459-463

Soll, D. R. u. D. R. Sonneborn (1971b)
Zoospore germination in Blastocladiella emersonii: Structural changes in relation to protein and RNA synthesis.
J. Cell Sci. 9, 679-699

Sorenson, W. G., H. W. Larsh u. S. Hamp (1971)

Acrylamide gel electrophoresis of proteins from Aspergillus species.
Am. J. Bot. 58, 588-593

Stebbing, W. (1972)

Amino-acid pool components as regulators of protein synthesis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.
Exptl. Cell Res. 70, 381-389

Steward, F. C. u. J. T. Barber (1964)

The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants.
Annals New York Acad. Sci. 121, 225-231

Sussman, M. (1966)

Growth and Development.
Foundations of Modern Biology, W. D. McElroy u. C. P. Swanson, eds; Prentice-Hall, Inc. 2. Aufl.

Szulmajster, J. (1973)

Initiation of bacterial sporogenesis.
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 23, 45-83

Taber, W. A. (1966)

Morphogenesis in Basidiomycetes.
in: Ainsworth u. Sussman 1966, Bd. II, Kap. 12

Taha, E. E. u. S. G. Knight (1961)

Physiological and chemical studies on mould proteins.
Arch. Mikrobiol. 39, 22-36

Talpasayi, E. R. S. u. M. R. Bahal (1967)

Cellular differentiation in Anabaena cylindrica.
Zeitschr. f. Pflanzenphysiologie 56, 100-101

Tan, K. K. u. H. A. S. Epton (1974)

Ultraviolet-absorbing compounds associated with sporulation in Botrytis cinerea.
Trans. Br. mycol. Soc. 63, 157-167

Tanaka, K. (1966)

Changes in ultrastructure of Aspergillus oryzae conidia during germination.
J. Gen. Appl. Microbiol. 12, 239-246

de Terra, N. u. E. L. Tatum (1963)

A relationship between cell wall structure and colonial growth in Neurospora crassa.
Am. J. Bot. 50, 669-677

Threefall, R. J. (1971)

Mutants of Botrytis alii.
Microbial Genet. Bull. 33, 4

Tiedemann, H. (1969)

Regulationsphänomene bei der Differenzierung.
Verhandlungen d. Schweizerischen Naturforsch. Gesellschaft., 149. Jahresversammlung

Topps, J. H. u. R. L. Wain (1957)

Fungistic properties of leaf exudates.
Nature 179, 652-653

Tripathi, R. K. u. D. Gottlieb (1974)

Sequential biosynthesis of ribonucleic acids during germination of teliospores of Ustilago maydis.
Mycologia 66, 413-421

Trocha, P. u. J. M. Daly (1970)

Protein and RNA synthesis during germination of uredospores.
Plant Physiol. 46, 520-526

Tschierpe, H. J. (1964)

Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Kohlendioxid für die Fruktifikation des Kulturchampignons Agraricus campestris.
Arch. Mikrobiol. 49, 405-425

Tsien, H. C. u. M. L. Higgins (1974)
Effect of temperature on the distribution of membrane particles in Streptococcus faecalis as seen by the freeze-etching technique.
J. Bacteriol. 118, 725-734

Turian, G. (1966)
Morphogenesis in Ascomycetes.
in: Ainsworth u. Sussman 1966, Bd. II., Kap. 11

Uno, I. u. T. Ishikawa (1973)
Purification and identification of the fruiting-inducing substances in Coprinus macrorhizus.
J. Bacteriol. 113, 1240-1248

Urayama, T. (1969)
Stimulative effects of extracts from fruit bodies of Agraricus bisporus and some other hymenomycetes on primordia formation in Marasmius sp.
Trans. Mycol. Soc. Jap. 10, 73-78

Webb, J. M. (1956)
A sensitive method for the determination of ribonucleic acid in tissues and microorganisms.
J. Biol. Chem. 221, 635-649

Webb, J. M. u. H. B. Levy (1955)
A sensitive method for the determination of DNA in tissues and microorganisms.
J. Biol. Chem. 213, 107-117

Werz, G. (1955)
Kernphysiologische Untersuchungen an Acetabularia. I. - III.
Planta 46, 113-153

Werz, G. (1957)
Eiweißvermehrung in ein- und zweikernigen Systemen von Acetabularia.
Experentia 13, 79

Werz, G. (1961)
Zur Frage der Herkunft und Verteilung cytoplasmatischer Ribonukleinsäure und ihrer Beziehung zu "Morphogenetischen Substanzen" bei Acetabularia mediterranea.
Z. Naturforsch. 16b, 126-129

Werz, G. (1962)
Zur Frage der Elimination von Ribonukleinsäure und Protein aus dem Zellkern von Acetabularia mediterranea.
Planta 57, 636-655

Werz, G. (1963)
Vergleichende Zellmembrananalysen bei verschiedenen Dasycladaceae
Planta 60, 322 - 330

Werz, G. (1965)
Determination and realization of morphogenesis in Acetabularia
Brookhaven Symp. in Biol. 18, 185-203

Werz, G. (1967)
Induktion von Zellwandbildung durch Fremdprotein bei Acetabularia
Naturwissenschaften 14, 374-375

Werz, G. (1968)
Plasmatische Formbildung als Voraussetzung für die Zellwandbildung bei der Morphogenese von Acetabularia
Protoplasma 65, 81-96

Werz, G. (1969)
Morphogenetic Processes in Acetabularia
20.Colloqu. Ges.Biol.Chemie, Mosbach
"Inhibitors. Tools in cell research"
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Werz, G. (1969)
Wirkungen von Colchicin auf die Morphogenese von Acetabularia
Protoplasma 67, 67-78

Werz, G. u. J. Hämmerling (1961)

Über die Beeinflussung artspezifischer Formbildungsprozesse von Acetabularia durch UV-Bestrahlung.
Z.Naturforsch. 16b, 829-832

van Wijk, R. u. T.M. Konijn (1971)

Cyclic 3',5-AMP in Saccharomyces carlsbergensis under various conditions of catabolic repression.
Fed.Eur.Biol.Soc.13, 184-186

Wilsenach, R. u. M.Kessel (1965)

The role of lomasomes in cell wall formation in Penicillium vermiculatum.
J.Gen.Microbiol. 40,401-404

Wright, B.E. (1966)

Multiple causes and control in differentiation
Science 153, 830-836

Wright, B.E. u. M.L. Anderson (1960)

Protein and amino acid turnover during differentiation in the slime mold.
Biochim. Biophs. Acta 43, 62-67

Yanagita, T. (1957)

The biochemical aspects of the germination of conidiophores of Aspergillus niger.
Arch. Mikrobiol. 26, 329-344

Yanagita, T. (1963)

Carbon dioxide fixation in germinating conidiospores of Aspergillus niger.
J.Gen.Microbiol. 9,343-351

Yokota, T. u. J.S. Gots (1970)

Requirement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate for flagella formation in Escherichia coli and Salmonella typhimurium
J.Bacteriol. 103, 513-516

Zalokar, M. (1959a)

Enzyme activity and cell differentiation in Neurospora.
A. J. Bot. 46, 555-559

Zalokar, M. (1959b)

Growth and differentiation of Neurospora hyphae.
Am. J. Bot. 46, 602-610

Zetsche, K. (1963a)

Das morphologische und physiologische Verhalten implantierter Zellkerne bei Acetabularia mediterranea.
Planta 60, 331-338

Zetsche, K. (1963b)

Der Einfluß von Kinetin und Giberellin auf die Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien.
Planta 59, 624-634

Zetsche, K. (1966a)

Anreicherung von Proteinsynthese induzierenden Substanzen in Acetabularia mediterranea unter dem Einfluß von Puromycin.
Z. Naturforsch.21b, 88-90

Zetsche, K. (1966b)

Regulation der UDP-Glukose 4-Epimerase Synthese in kernhaltigen und kernlosen Acetabularien.
Biochim.Biophys.Acta 124, 332-338

Zetsche, K. (1967)

Unterschiedliche Zusammensetzung von Stiel- und Hutzellwand bei Acetabularia mediterranea.
Planta 76, 326-334

Zetsche, K. (1968)

Regulation der UDPG-Pyrophosphorylaseaktivität in Acetabularia.
I. Morphogenese und UDPG-Pyrophosphorylase-Synthese in kernhaltigen und kernlosen Zellen.
Z. Naturforsch. 23b, 269-376

Zetsche, K. (1969)
Regulation der UDPG-Pyrophosphorylaseaktivität in Acetabularia.
II. Unterschiedliche Synthese des Enzymes in verschiedenen Zellregionen
Planta 89, 244-253

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit vom 1.10. 1971 bis 30.9. 1974 am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin in der Abteilung Elektronenmikroskopie und Feinstrukturforschung durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Günther Werz für seine Bereitschaft, das Thema dieser Arbeit in seiner Abteilung bearbeiten zu lassen, für die Bereitstellung eines Laborplatzes, für hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie für sein Interesse am Gelingen der Arbeit.
Für die Aufnahme der Arbeit in das Schwerpunktprogramm der Deutschen Forschungsgemeinschaft "Biochemie der Morphogenese", sowie für die großzügige finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
Herrn Diplombiologen Lüder Göke danke ich für zahlreiche Diskussionen über methodische und theoretische Probleme.
Herrn M. Wehner gilt mein Dank für seine Hilfe bei der technischen Durchführung der Gefrierätzungen, wie auch Frau E. Dorn für ihre sorgfältige Bearbeitung eines Teils des fotografischen Materials.

Berlin, Oktober 1975

Lebenslauf

Am 25. April 1945 wurde ich als Sohn des Uhrmachermeisters Bruno Kowalski und seiner Ehefrau Ilse, geborene Wege, in Burg auf Fehmarn geboren.

Ab 1951 besuchte ich die Evangelische Schule in Berlin-Frohnau und wählte nach der Grundschulzeit den wissenschaftlichen Zweig neusprachlichen Zuges der selben Schule. Hier legte ich 1964 die Reifeprüfung ab.

Nach zweijähriger Lehrzeit und bestandenem Pharmazeutischen Vorexamen arbeitete ich bis 1969 als Pharmazeutisch Technischer Assistent.

Zum Wintersemester 1966/67 wurde ich an der Freien Universität Berlin im Fach Botanik immatrikuliert. Die Diplomvorprüfung bestand ich 1969 und begann 1970 die Diplomarbeit bei Prof. Dr. Ch. Thielke an der Freien Universität. Ich legte die Diplomhauptprüfung 1971 ab. Der experimentelle Teil der Dissertation wurde in der Zeit von 1971 bis 1974 bei Prof. Dr. G. Werz am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

Ich arbeitete von 1970 bis 1971 als studentische Hilfskraft bei Prof. Dr. Ch. Thielke. Von 1971 bis 1974 hatte ich einen Privatdienstvertrag (DFG) als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. G. Werz. Seit 1.10. 1974 bin ich wissenschaftlicher Assistent an der Technischen Universität Berlin im Fachbereich Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie bei Prof. Dr. S. Windisch.

Seit 9.6.1971 bin ich mit der Diplombiologin Susanne Eisenbeis verheiratet.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198